

Université de Montréal

**Étude des propriétés protectrices et de la signalisation
des cannabinoïdes dans un modèle animal d'ischémie
cardiaque**

Contra angorem cannabis cordem protegit

par

Philippe Lépicier

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor*
en Sciences Pharmaceutiques
option Pharmacologie

Février 2006

© Philippe Lépicier, 2006



QV

705

U58

2006

V. 012

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Étude des propriétés protectrices et de la signalisation des cannabinoïdes dans un modèle
animal d'ischémie cardiaque

présentée par :
Philippe Lépicier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Albert Adam, président-rapporteur
Dr Daniel Lamontagne, directeur de recherche
Dr Pierre Beaulieu, membre du jury
Dr Luc Rochette, examinateur externe
[Taper le nom] , représentant du doyen de la FES

Résumé

Nous avons décrit, dans le présent ouvrage, les propriétés cardioprotectrices de divers endocannabinoïdes et d'agonistes synthétiques agissant sur les récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2. Pour arriver à nos conclusions, nous avons reproduit un épisode d'ischémie-reperfusion chez des animaux dans un protocole *ex vivo* de rétroperfusion selon Langendorff et un second, *in vivo* d'ischémie locale transitoire. Nous avons étudié les voies de signalisation impliquées dans ce phénomène par des études de pharmacologie classique et de biologie moléculaire. Des agonistes sélectifs pour le récepteur CB1 ou CB2 ont causé tous deux une diminution significative de la taille de l'infarctus suite à un épisode d'ischémie-reperfusion par un mécanisme distinct et indépendant. L'activation du récepteur CB1, situé principalement sur les cellules endothéliales, semble induire l'expression de la protéine iNOS, la production de monoxyde d'azote et la phosphorylation de ERK1/2. L'activation du récepteur CB2, situé sur les cardiomyocytes, semble induire la phosphorylation de la p38 MAPK et cause une amélioration de la récupération fonctionnelle à la reperfusion en plus de la diminution de la taille d'infarctus. Le palmitoylethanolamide a, quant à lui, causé une amélioration de la récupération fonctionnelle, inhibées par un agoniste inverse pour le récepteur CB2, un inhibiteur de la p38 MAPK ou de la PKC, et dans une moindre mesure par un inhibiteur de ERK1/2. L'administration intra-veineuse d'un agoniste non sélectif pour les récepteurs CB1 et CB2 (CP55940) a provoqué une chute de pression artérielle attendue et partiellement renversée par l'agoniste inverse pour le récepteur CB1. L'effet protecteur du CP55940 sur la taille de l'infarctus en fonction de la zone à risque dans le modèle *in vivo* a été renversé seulement par l'agoniste inverse pour le récepteur CB2.

Mots-clés : cannabinoïdes, cœur, ischémie, reperfusion, signalisation, MAPK, monoxyde d'azote

Abstract

The object of the current work is to describe the cardioprotective properties of several cannabinoid agonists acting on CB1 and CB2 receptors. In order to do so, we have performed experiments reproducing ischemia and reperfusion in an *ex vivo* Langendorff model of heart retroperfusion and an *in vivo* model of local transient ischemia. We have furthermore studied the signalling pathways involved in the aforementioned protection with classical pharmacology experiments and molecular biology assays. Both the CB1 and the CB2 selective agonist have provoked a significant fall in infarct size following ischemia and reperfusion. The two agonists have provoked distinct and independent cardioprotection involving different pathways. Activation of the CB1 receptor, located on endothelial cells in the cardiac ventricle, have induced expression of iNOS protein, production of nitric oxide and phosphorylation of ERK1/2. Activation of the CB2 receptor, located mainly on the cardiomyocytes, seemed to have provoked the phosphorylation of p38 MAPK and improved functional recovery of the heart during reperfusion as well as infarct size. Palmitoylethanolamide have improved functional recovery, which was blocked by a CB2 inverse agonist, a p38 MAPK inhibitor, a PKC inhibitor and partially by a ERK1/2 inhibitor. Intravenous administration of a non-selective cannabinoid agonist (CP55940) has caused a fall in blood pressure, partially reversed by a CB1 inverse agonist. Protective properties of the CP55940 on infarct size in the *in vivo* model have been blocked by a CB2 inverse agonist.

Keywords : cannabinoids, heart, ischemia, reperfusion, signaling pathways, MAPK, nitric oxide

Table des matières

1A. L'ischémie-reperfusion

a) L'ischémie cardiaque	1
b) La reperfusion cardiaque	3
c) Réaction inflammatoire dans l'ischémie-reperfusion	5
d) Préconditionnement ischémique (IPC).....	6
e) Voies de signalisation impliquées dans l'ischémie-reperfusion et de l'IPC	
e.i) Protéine kinase C	7
e.ii) ERK 1/2 (p44/p42 MAPK)	9
e.iii) p38 MAPK	12
f) Rôle du NO et de sa synthèse dans l'ischémie, la reperfusion et l'IPC	17

1B. Pharmacologie des cannabinoïdes

g) Identification et caractéristiques de certains endocannabinoïdes	21
h) Synthèse des endocannabinoïdes et du PEA.....	23
i) Catabolisme des endocannabinoïdes	26
j) Récepteurs CB1 et CB2	27
k) Voies de signalisation associées aux récepteurs CB1 et CB2	30
l) Effets vasodilatateurs des cannabinoïdes	32
m) Propriétés cardioprotectrices des cannabinoïdes	37

2. Hypothèse et Objectifs du projet de recherche40

3. Matériels et Méthodes	41
a) Modèle <i>ex vivo</i> de perfusion selon Langendorff	42
b) Modèle d'ischémie <i>in vivo</i>	47
c) Taille d'infarctus et évaluation de la zone à risque	50
d) Extraction de protéines	51
e) Immunobuvardage	54
f) Précipitation de la protéine NO synthétase inducible (iNOS)	57
g) Essai kinase <i>in vitro</i>	58
h) Immunohistochimie	60
i) Extraction d'ARN et RT-PCR	62
j) Statistiques	64
 4. Résultats	
a) Identification de l'ARN et de la protéine des récepteurs CB1 et CB2	65
b) Immunohistochimie des récepteurs CB1 et CB2 dans le cœur	69
c) Effets des cannabinoïdes sur la récupération fonctionnelle et les arythmies	72
d) Effets des cannabinoïdes sur la taille de l'infarctus	90
e) Étude des voies de signalisation impliquées	97
f) Rôle du NO dans l'effet protecteur des cannabinoïdes	107
g) Rôle des HSP 27 et 70 dans l'effet protecteur des cannabinoïdes	110

5. Discussion

a) Modèles animaux	112
b) Récepteurs	117
c) Cannabinoïdes et cardioprotection	120
d) Variation de la pression artérielle dans le modèle <i>in vivo</i>	127
e) Produit FC×PA dans le modèle <i>in vivo</i>	133
f) Arythmies	134
g) Voies de signalisation	135
h) Monoxyde d'azote	139
i) HSP 27 et 70	141
j) Potentiel thérapeutique du rimonabant (SR141716A)	142

6. Conclusion	143
----------------------------	------------

Bibliographie	145
----------------------------	------------

Annexe I Au cœur du préconditionnement ischémique	xvii
--	-------------

Annexe II La marijuana en usage thérapeutique	xxiv
--	-------------

Annexe III Recettes de tampons	xxxix
---	--------------

Annexe IV Séquences des ARNm des récepteurs CB1 et CB2	xxxiii
---	---------------

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des anticorps utilisés	56
Tableau 2. Valeurs basales de paramètres physiologiques (1 ^{re} série d'expériences)	73
Tableau 3. Valeurs des paramètres physiologiques (2 ^e série d'expériences)	78
Tableau 4. Données de pression artérielle et du produit PA×FC dans le modèle <i>in vivo</i> ...	86
Tableau 5. Degré de phosphorylation des MAPK	104

Liste des figures

Figure 1. Schéma des 3 familles de PKC.....	8
Figure 2. Schéma de la famille des MAPKs.....	11
Figure 3. Schéma de la synthèse de l'anandamide	24
Figure 4. Schéma de la synthèse du 2-AG	25
Figure 5. Diagramme illustrant la vasorelaxation induite par l'anandamide.....	36
Figure 6. Formule chimique développée du Δ^9 -THC et du HU-210	37
Figure 7. Schéma du modèle de perfusion selon Langendorff.....	44
Figure 8. RT-PCR et Immunobuvardage des récepteurs CB1 et CB2	66
Figure 9. Variation du récepteur CB1 dans le cœur	67
Figure 10. Variation du récepteur CB2 dans le cœur	68
Figure 11. Immunohistochimie des récepteurs CB1 et CB2 dans le ventricule	70
Figure 12. Récupération du dP/dt et du LVDP avec le PEA et les agonistes inverses	74
Figure 13. Récupération du dP/dt et du LVDP avec les agonistes inverses seuls	75
Figure 14. Récupération du dP/dt avec des agonistes sélectifs	79
Figure 15. Élévation du LVDP avec des agonistes sélectifs	80
Figure 16. Récupération du dP/dt en fonction du moment d'administration du JWH133 ...	82
Figure 17. Élévation du LVDP en fonction du moment d'administration du JWH133	83
Figure 18. Courbes de survie des animaux dans le modèle <i>in vivo</i>	88
Figure 19. Sévérité des arythmies dans le modèle <i>in vivo</i>	89
Figure 20. Taille d'infarctus (endocannabinoïdes et agonistes synthétiques)	91
Figure 21. Taille d'infarctus (agonistes sélectifs et agonistes inverses)	93
Figure 22. Taille d'infarctus en fonction du moment d'administration du JWH133	94
Figure 23. Taille d'infarctus en fonction de la zone à risque (modèle <i>in vivo</i>)	96
Figure 24. Récupération du dP/dt (PEA et inhibiteurs des voies de signalisation)	99
Figure 25. Élévation du LVDP (PEA et inhibiteurs des voies de signalisation)	100
Figure 26. Taille d'infarctus (PEA et inhibiteurs des voies de signalisation)	101

Figure 27. Immunobuvardage des MAPK phosphorylées et totales	103
Figure 28. Phosphorylation et activité kinase (agonistes sélectifs)	106
Figure 29. Effet du NNLA sur la cardioprotection et induction de iNOS	109
Figure 30. Effet du NNLA sur la récupération du dP/dt (agonistes sélectifs)	110
Figure 31. Expression relative des HSP27 et 70	112
Figure 32. Formule chimique développée de quelques dérivés d'anandamide	124
Figure 33. Formule chimique développée (Δ^9 -THC, JWH015 et JWH133)	125
Figure 34. Formule chimique développée (Δ^9 -THC, CP55940, CBD et ABN-CBD)	128
Figure 35. Formule chimique développée (SR141716A, AM251 et SR144528)	130

Liste des abréviations utilisées dans la thèse

2AG	2-arachidonyl glycérol
ACEA	arachidonyl-2'-chloroéthylamide
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AP1	activator protein-1
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphates
BCA	bicinchoninic acide
BSA	bovine serum albumin
CHO	chinese hamster ovary
CXCL8	CXC chemokine ligand-8
DAG	diacylglycérol
DTT	dithiothréitol
EDHF	endothelial derived hyperpolarising factor
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethyleneglycol bis(β -aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
ERK	extracellular regulated kinase
FAAH	fatty acid amide hydrolase
GMPc	guanylate monophosphate cyclique
HSP	heat shock protein
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IL-1	interleukine-1
IL-1 β	interleukine-1 β
IL-6	interleukine-6
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IP3	inositol triphosphate
IPC	ischemic preconditioning
JNK	janus kinase
LPS	lipopolysaccharide
MAGL	monoacyl glycérol lipase
MAPK	mitogen activated protein kinase
NaF	fluorure de sodium
NNLA	N-nitro-L-arginine
NOS	nitric oxide synthase
OEA	oleyléthanamide
PBS	phosphate buffer solution
PE	polyéthylène
PEA	palmitoyléthanamide
PI3K	phosphatidyl inositol-3 kinase
PKC	protéine kinase C
PKG	protéine kinase G
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyl
PPAR α	peroxysome proliferator-activated receptor- α

RACK	receptor for activated C kinase
SAPK3	stress activated protein kinase-3
SHR	spontaneously hypertensive rat
SNP	nitroprussiate de sodium
Thr	thréonine
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TRPV1	transient receptor potential vanilloid-1
TTC	chlorure de triphényltétrazolium
Tyr	tyrosine
Δ^9 THC	Δ^9 -tétrahydrocannabinol

*Je dédie cette thèse à celui qui lira
non par devoir ou par amour de moi,
mais bien avec un seul intérêt scientifique,
car seulement à ce moment les travaux décrits ici
perdront leur vanité*

Remerciements

La réalisation de cette thèse n'est certes pas le fruit d'un seul homme et je ne saurais taire la contribution personnelle ou scientifique de plusieurs proches et collaborateurs qui ont su faire en sorte de concrétiser la complétion d'un tel projet.

Le choix d'un directeur de thèse est crucial dans le développement d'un étudiant et déterminant dans la réussite de celui-ci. À cet égard, je tiens à exprimer mon admiration et mon plus grand respect au professeur Daniel Lamontagne, qui a su, avec beaucoup de justesse, superviser mes études supérieures. Il a toujours encouragé le développement d'une pensée critique et une autonomie dans le choix des projets. Il a su maintenir mon intérêt dans la recherche en me permettant de développer les méthodes de mon choix afin d'approfondir mes intérêts scientifiques.

Je voudrais aussi témoigner mon amour sincère à ma fiancée, Mlle Marie-Hélène Miousse, « qui m'aime et me comprend ». Elle a accepté de partager ma vie pour le meilleur et pour le pire, a vécu avec moi tous les moments de ce chapitre-ci et a fait de moi un homme meilleur.

Cette thèse est l'aboutissement de ma formation académique et je voudrais donc aussi remercier toutes les personnes qui ont contribué à celle-ci. Mes parents, Mme Lucie Laporte et M. René Lépicier ont été les premiers instituteurs de ma vie et ont su dès mon jeune âge développer ma curiosité et stimuler mon intellect. Plusieurs autres professeurs ont aussi marqué mon développement académique dont le Frère Willie Gagnon, c.s.v., Mme Michèle Sarrazin, le père Réal Aubin, c.s.v., Mme Marie-Alice Brière, professeur Nigel Phillips, Ph.D., professeure Sylvie Marleau, Ph.D. et professeur Pierre Moreau, Ph.D.

M. Mario Filion, Ph.D., a été mon premier superviseur et est l'instigateur de mon cheminement en recherche fondamentale. Je voudrais souligner que M. Filion a, dès mes débuts, eu confiance dans mon travail, ce qui a eu un impact très positif dans mon désir de faire des études graduées.

J'ai eu le bonheur de travailler avec des étudiants qui ont influencé mes recherches et parmi lesquels j'ai le privilège de nommer plusieurs, mes amis. M. Huy Hao Dao, Ph.D., maître échiquier et confident, professeur Jean-François Bouchard, Ph.D., amateur de Joe et d'Elvis, Mme Esther Millette, Ph.D., la panthère, Mme Caroline Lagneux, Ph.D., avec qui j'ai collaboré pour quelques expériences décrites dans cette thèse, M. Giuseppe Molinaro, Ph.D., amateur de hockey accompli et quilleur en devenir, Mlle Christine Hamel, M.Sc., dont l'assiduité et le calme ont été inspirants et M. Vincent Blouin, M.Sc., avec qui j'ai eu le plaisir de faire le tour du monde en 3 minutes 20 secondes.

Trois stagiaires ont contribué à la réalisation de cette thèse et dont j'ai supervisé la formation. Mlle Anne-Marie Lampron, B.pharm., a réalisé un projet sur l'impact du moment d'administration d'un agoniste CB2 sur l'effet cardioprotecteur de celui-ci, présenté dans le présent ouvrage. M. Sébastien Aubin, B.pharm., a travaillé sur l'impact de l'administration d'agonistes sélectifs aux récepteurs CB1 ou CB2 sur le relargage de cytokines pro-inflammatoires. Mlle Marie Lordkipanidze, B.pharm., a réalisé un projet sur la présence d'enzymes métabolisant la bradikine dans un modèle de rat diabétique.

Je tiens à remercier tous les membres du jury qui évalueront ce travail. Je leur suis gré de la probité et du soin avec lesquels ils s'acquitteront de leur tâche. C'est aussi un honneur pour moi que le professeur Albert Adam, Ph.D., pour qui j'ai beaucoup d'affection, ait accepté de présider au jury de cette thèse.

Avant Propos

Cette thèse est une illustration d'un moyen plus que d'une fin, elle traduit un processus en vue d'atteindre un état d'ignorance supérieure, doctorale. Tel que définie par Montaigne dans ses Essais, par opposition à l'ignorance abécédaire, l'ignorance doctorale se veut une illustration de l'ouverture d'un esprit à un univers de connaissances préalablement absent de sa nature intrinsèque. Contrairement à la sortie de la caverne de Platon où l'homme apprend à voir la nature de sa réalité avec une perspective différente, l'atteinte de cet état d'ignorance doctorale confirme l'introduction d'une réalité auparavant inconnue, entraînant de nouvelles connaissances d'où naissent une toute nouvelle dimension de questionnements. Ces propos illustrent que l'ignorance naît de la connaissance, et que la recherche multiplie par son succès les motifs de recherche. Nous pouvons présumer que seul un état d'ignorance absolu pourrait conduire un sujet à se considérer omniscient.

C'est pourquoi nous voulons démontrer ici que la recherche ne peut être une finalité en soi. La perspective de la thèse comme d'un moyen nous conduit à la considérer davantage comme un outil, une méthode d'enseignement où l'étudiant en arrivera à apprendre de ses propres observations, à devenir à la fois maître et apprenti, et, ultimement, à développer cette autonomie essentielle pour poursuivre une formation au-delà d'un cadre établi par l'institution. C'est cette méthode, ce moyen, donc, qui l'amènera, nourri par sa curiosité, à appliquer ce moyen pour transcender son quotidien.

1A. L'ischémie-reperfusion

1A.a) L'ischémie cardiaque

L'ischémie est un phénomène dynamique, dont le dommage résultant dépend à la fois de sa durée et de sa sévérité(1). L'ischémie porte des conséquences plus néfastes que l'hypoxie, puisqu'elle implique, en plus du manque d'oxygène, une accumulation de métabolites potentiellement toxiques. Les protons (H^+) et les lactates s'accumulent dans le cœur ischémié, fruit de la respiration anaérobie, et produisent un effet inotrope négatif. Les protons sont expulsés à l'aide de l'échangeur Na^+/H^+ , contribuant ainsi à une accumulation intracellulaire de sodium. De plus, les ions phosphates, les lactates et le potassium sortent des cardiomyocytes ischémiés sans pouvoir être rincés de l'espace extracellulaire, ce qui peut produire des foyers d'arythmies, appelés courant de lésion. Le potassium agit ici comme contre ion pour compenser électriquement la perte de phosphate et de lactate et la diminution du ratio $[K^+]_i / [K^+]_o$ responsable du potentiel membranaire selon l'équation de Nernst, entraîne une dépolarisation du myocyte(2). Le potentiel membranaire pour un ion donné (E_{ion}) est déterminé par la constante des gaz (R), la température absolu en Kelvin (T), la valence de l'ion (z), la constante de Faraday (F) et le logarithme népérien du quotient de la concentration ionique extracellulaire par celle intracellulaire $\ln(C_e/C_i)$.

Equation de Nernst :
$$E_{ion} = [(RT)/(zF)] \bullet \ln C_e / C_i$$

La déplétion en ATP est certainement néfaste pour le cœur qui doit compenser ce manque énergétique, mais la contractilité et l'efficacité de la pompe sont compromises avant même que les réserves d'ATP soient épuisées. Le raccourcissement des sarcomères, causé par une diminution du remplissage ventriculaire, entraînera, conformément à la loi de Starling, une diminution de la contractilité cardiaque. L'accumulation de calcium intracellulaire dans le cœur ischémié découle de plusieurs mécanismes qui permettent au calcium extracellulaire de pénétrer dans l'espace intracellulaire et qui empêche la cellule d'expulser efficacement celui-ci à l'extérieur après la contraction. L'accumulation de sodium, empêchant l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de fonctionner normalement, et la carence énergétique, empêchant le fonctionnement de la pompe à calcium, contribuent à cette accumulation et préviennent la relaxation adéquate du myocarde causant le phénomène de contracture observé. Celui-ci peut être accentué par la reperfusion qui amène une nouvelle source de calcium extracellulaire. La mesure de la pression ventriculaire diastolique enregistrée lors de la reperfusion dans nos protocoles illustre ce phénomène de contracture. La mort des cardiomyocytes dans une zone ischémiée apparaît entre 15 et 40 minutes après le début de l'occlusion coronaire et peut se poursuivre pendant environ 6 heures, après quoi la presque totalité des cardiomyocytes sont morts.

1A.b) La reperfusion cardiaque

« 15 minutes avant la fin de l'ischémie, le cœur n'était toujours pas reperfusé. »

Nous définirons la reperfusion dans le cadre de cette thèse comme la résolution de la perfusion sanguine (ou à l'aide d'un tampon) d'une zone d'un tissu en ayant préalablement été privé totalement ou partiellement et marquant la fin de la période dite ischémique. La reperfusion est le seul phénomène connu pouvant freiner l'évolution du dommage ischémique vers la nécrose. Malgré cela, et bien que le lien de cause à effet entre l'ischémie et le dommage cardiaque soit indiscutable, la reperfusion, par elle-même, entraîne aussi un dommage cardiaque qui peut se présenter sous diverses formes(1). C'est pourquoi le trait d'humour inséré plus haut n'est pas aussi trivial qu'il n'y paraît. La reperfusion amène soudainement une quantité importante d'oxygène, de calcium et de leucocytes, qui peuvent contribuer au dommage subi à la reperfusion.

Les tachyarythmies de reperfusion seront causées par trois mécanismes principaux: 1. la dépolarisation des cardiomyocytes ischémiés causant des courants de lésion; 2. l'accélération de l'activité du pacemaker ventriculaire et les dépolarisations transitoires (causées par une surcharge calcique); et 3. l'apparition de circuits de réentrées dans les tissus cicatriciels(2). Les bradyarythmies sont habituellement causées par un bloc du nœud auriculo-ventriculaire (nœud AV) fonctionnel, d'origine vagale (possiblement aggravé par

des β -bloqueurs ou des bloqueurs calciques) ou anatomique causé par un dommage permanent de la structure de conduction.

La sidération myocardique (*myocardial stunning*) se définit plutôt comme une altération prolongée de la fonction cardiaque observée après la reperfusion malgré l'absence de dommage permanent du myocarde. Elle est donc réversible, mais sa durée est proportionnelle à la durée et à la sévérité de l'ischémie préalable. Son mécanisme exact est encore mal compris, mais la surcharge calcique et la production de radicaux libres seraient impliquées dans les conséquences fonctionnelles, soit la diminution de la sensibilité calcique des myofibrilles et la réduction de la force maximale développée(1). La mesure de la contractilité ventriculaire ($dP/dt+$) effectuée dans nos protocoles nous donne un indice de la sévérité de cette sidération.

Lorsque les métabolites toxiques et les radicaux libres accumulés pendant toute la durée de l'ischémie sont soudainement et simultanément remis en circulation, et entrent en contact avec l'oxygène, le cœur subit un stress oxydatif considérable. Les radicaux libres sont des espèces très réactives et instables. Ils peuvent oxyder bon nombre de constituants cellulaires soit : acides aminés, sucres, lipides, acides organiques et nucléiques(1). Les acides gras des phospholipides membranaires sont particulièrement sensibles à cette dégradation oxydative. Les cellules endothéliales étant les premières à entrer en contact avec ces espèces réactives, elles subissent une partie importante du dommage infligé par

celles-ci et la dysfonction endothéliale observée lors de la reperfusion peut être causée, entre autre, par ce phénomène.

1A.c) Réaction inflammatoire dans l'ischémie-reperfusion

Le dommage cardiaque lors de la reperfusion est causé en partie par l'infiltration des neutrophiles via une interaction entre leurs molécules d'adhésion (les intégrines) et les ICAM-1 des cellules endothéliales. Les molécules ICAM-1 sont présentes de façon constitutive sur les cellules endothéliales, mais leur expression peut être induite par certaines cytokines dont le $\text{TNF}\alpha$ et l'IL-1. Plusieurs cytokines peuvent induire la molécule ICAM-1 sur les cardiomyocytes mais l'IL-6 serait la plus puissante à cet égard(3).

L'IL-6 peut elle-même être induite en 15 minutes par le $\text{TNF}\alpha$ libéré pendant l'ischémie et provenant de la dégranulation des mastocytes cardiaques(4). L'ARNm de l'IL-6 a aussi été identifié dans les myocytes adjacents aux zones ayant subi l'ischémie dans un modèle canin d'ischémie-reperfusion de même que dans des cardiomyocytes traités au $\text{TNF}\alpha$, à l'IL-1 β ou avec des extraits lymphocytaires recueillis en période post-ischémique(5). Ces résultats suggèrent la présence d'une cascade d'activation déclenchée par la reperfusion, conduisant au dommage cellulaire.

1A.d) Préconditionnement ischémique (*Ischemic preconditioning, IPC*)

Le preconditionnement ischémique, tel que décrit par Murry *et al.* dans les années 80, est un phénomène naturel contribuant à la réduction du dommage cardiaque subi suite à un épisode d'ischémie-reperfusion(6). Il est provoqué par un ou plusieurs courts épisodes d'ischémie, d'environ 5 minutes, suivis d'une reperfusion et confère à la fois une fenêtre de protection aiguë, de courte durée, et une seconde, qui débute environ 24 heures après le preconditionnement, que l'on nomme preconditionnement tardif. Le preconditionnement ischémique est, à ce jour, le phénomène cardioprotecteur naturel le plus puissant, et a été observé chez plusieurs espèces animales. Nous discuterons des voies de signalisation impliquées dans l'IPC de même que du rôle du monoxyde d'azote et des synthétases de monoxyde d'azote (NOS) dans les sections ultérieures. L'IPC reste encore aujourd'hui très étudié et les conclusions que l'on en tire s'avèrent souvent de bons indices des mécanismes cardioprotecteurs de différentes substances tant endogènes qu'exogènes.

1A.e) Voies de signalisation impliquées dans le phénomène d'ischémie reperfusion et de l'IPC

1A.e.i) Protéine kinase C

La protéine kinase C (PKC) est en fait une famille de kinase divisée en trois principales catégories : 1. Classique, dépendante du Ca^{2+} , qui comprend les isoformes α , β et γ ; 2. Nouvelle, indépendante du Ca^{2+} , qui comprend les isoformes η , θ , δ et ϵ ; 3. Atypique, indépendante du Ca^{2+} et du DAG, qui comprend les isoformes λ , μ , ζ et ι . Selon la catégorie, l'activation de la PKC requiert différents stimuli comme l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire, la libération de DAG et d' IP_3 . La migration de la PKC vers la membrane cellulaire, suivant son activation, est effectuée grâce à un récepteur RACK (*receptor for activated C kinase*) spécifique à chaque isoforme. C'est après cette translocation que le substrat approprié sera phosphorylé par la kinase. La translocation de plusieurs isoformes de PKC (α , δ , ϵ and ι) durant l'ischémie a été rapportée dans la littérature(7;8).

L'étude de la PKC et de ses différentes isoformes est intéressante dans le contexte de l'IPC. Fryer *et al.* ont rapporté une perte de l'effet cardioprotecteur de l'IPC suite à un pré traitement avec la chélérythrine, un inhibiteur non sélectif de la PKC, sur des cœurs perfusés(9). Ping *et al.* ont aussi montré l'importance de la PKC dans l'IPC, plus particulièrement dans l'activation de ERK 1/2 par l'IPC(10). Saurin *et al.* ont identifié plus

particulièrement l'isoforme ϵ , à l'aide d'un modèle de souris invalidées, comme revêtant une importance particulière dans le phénomène de l'IPC(11). D'autres auteurs ont confirmé l'importance de l'isoforme ϵ , son activation et sa translocation, dans le phénomène de cardioprotection causé par l'IPC(12). Fryer *et al.* ont démontré l'importance du rôle de l'isoforme δ dans les propriétés cardioprotectrices des opioïdes(13). Différentes isoformes pourraient être impliquées dans différents stimuli cardioprotecteurs à des moments distincts.

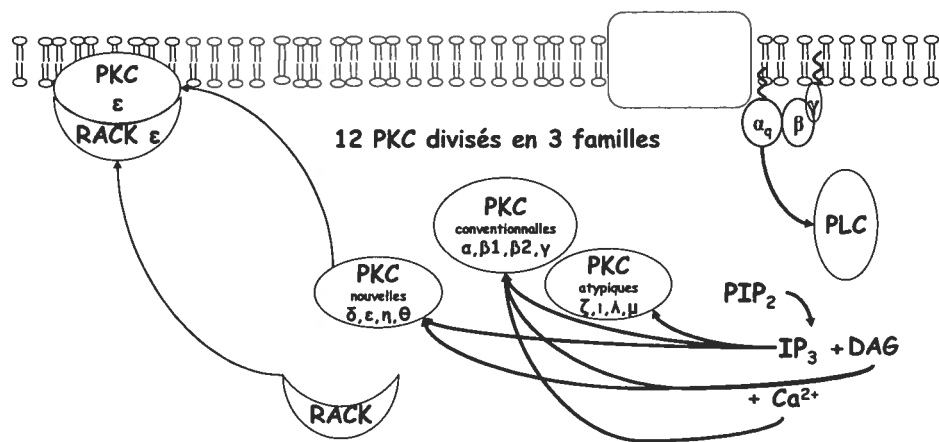


Figure 1. Schéma des trois familles de PKC.

1A.e.ii) ERK 1/2 (p44/p42 MAPK)

Les protéines ERK 1/2, acronyme pour *extracellular regulated kinase*, sont deux kinases faisant partie de la grande famille des MAPK, *mitogen activated protein kinase*. Elles sont généralement phosphorylées par deux kinases de la famille des MAPK kinase, respectivement MEK1 et MEK2. Le célèbre maréchal de François 1^{er}, La Palice, si Dieu eût pu lui prêter vie jusqu'à nos jours, aurait pu lui-même affirmer que ERK 1/2 sont activées dans le myocarde lors de la reperfusion et qu'elles sont impliquées dans la récupération post ischémique. Nous fournirons tout de même quelques références afin qu'il ne se sente pas trop seul(14-17). Omura *et al.* ont décrit la cinétique d'activation de ERK 1/2 à 5, 15, 30 et 90 minutes de reperfusion dans un modèle *in vivo* d'ischémie régionale en utilisant la technique du *in gel kinase assay*(15). L'augmentation maximale de l'activité kinase pour ERK1 (4,1 fois) et ERK 2 (2,9 fois) a été rapportée après 30 minutes de reperfusion et a été maintenue pour 90 minutes après la reperfusion. Aucune modification de la phosphorylation ou de l'activité kinase de ERK 1 n'a été observée pendant l'ischémie (après 30, 60 ou 90 min) alors que l'activité de ERK 2 a légèrement diminué pendant la même période (respectivement 40, 49 et 60% de l'activité kinase originale). Il a été récemment rapporté par Hausenloy *et al.*, dans un modèle de rétroperfusion selon Langendorff, que la phosphorylation de ERK 1/2, après 15 minutes de reperfusion suivant 35 minutes d'ischémie régionale, n'était pas augmentée dans le groupe témoin, mais

seulement dans le groupe préconditionné(18). La méthodologie décrite ne permet pas d'expliquer les raisons d'une observation qui semble contredire des années de recherche.

Si, à l'exception de ces derniers résultats décrits, les auteurs s'accordent sur l'activation de ERK 1/2 lors de la reperfusion, le rôle protecteur de ERK 1/2 sur la récupération cardiaque n'a pas encore été remis en question. Ainsi, une activation plus soutenue suite à un stimulus protecteur a été décrite dans le cas de l'IPC(10;18), des opioïdes(19), de l'adénosine(20) et des cannabinoïdes(21). Fryer *et al.* ont observé une augmentation de la phosphorylation tant pour ERK 1 que pour ERK 2 après 5, 30 et 60 minutes de reperfusion chez les groupes préconditionnés et traités avec le TAN-67, un agoniste des récepteurs opioïdes δ_1 . Une augmentation significative, mais plus modeste, a aussi été observée pendant l'ischémie chez le groupe préconditionné seulement. Un article récent a passé en revue les dernières études portant sur l'IPC, dans les modèles *in* et *ex vivo* de cœur et *in vitro* de cardiomyocytes, et confirme cette impression générale supportant le rôle protecteur de l'activation de ERK 1/2 lors de la reperfusion(12).

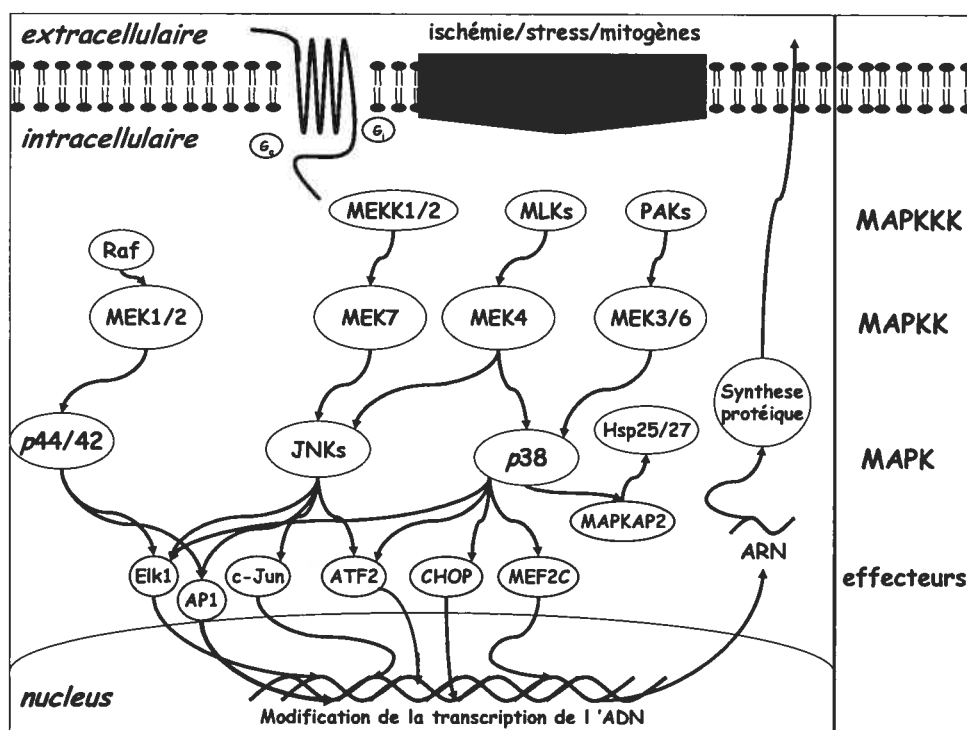


Figure 2. Schéma résumant les trois principales MAPK, leurs effecteurs ainsi que les kinases en amont de leurs cascades.

1A.e.iii) p38 MAPK

La p38 MAPK est aussi une protéine faisant partie de la famille des MAPK. Elle partage avec la protéine Janus kinase (JNK), préalablement nommée *just another kinase*, la nouvelle appellation SAPK, acronyme de *stress activated protein kinase*. Comme la nouvelle nomenclature l'indique, elle est généralement activée par un stress environnemental ou cellulaire. Dans un modèle de cœur perfusé chez le rat, Yin *et al.* ont rapporté une phosphorylation transitoire de la p38 MAPK sur un résidu tyrosine après 20 minutes d'ischémie complète dans un modèle *ex vivo*, qui n'était plus détectée après 45 minutes d'ischémie. Dans les mêmes conditions expérimentales, la phosphorylation a de nouveau été observée à la reperfusion, avec une phosphorylation maximale après 15 minutes de reperfusion, et maintenue pendant 3 heures de reperfusion. Gorog *et al.* ont aussi noté une élévation de la phosphorylation de la p38 MAPK avec un anticorps reconnaissant la double phosphorylation Thr180/Tyr182 de la p38 MAPK après 60 et 120 minutes d'ischémie dans un modèle murin de cœur perfusé selon un modèle de Langendorff(22). La disponibilité commerciale de tels anticorps s'est révélée un outil très attendu pour l'étude de l'activation de la p38 MAPK, car la double phosphorylation Thr180/Tyr182, reconnue par ceux-ci, est nécessaire à l'activité kinase de la p38 MAPK(23). Omura *et al.* n'ont observé, quant à eux, aucun changement dans les niveaux de phosphorylation ou d'activité kinase de la p38 MAPK à l'ischémie ou la reperfusion dans leur modèle *in vivo* d'ischémie régionale chez le rat(15). Dans le même modèle

animal, Fryer *et al.* n'ont, eux non plus, rapporté aucun changement significatif de la phosphorylation de la p38 MAPK pendant l'ischémie ou la reperfusion en utilisant un anticorps polyclonal reconnaissant la double phosphorylation Thr180/Tyr182(16).

Weinbrenner *et al.* ont observé une élévation transitoire de la phosphorylation de la p38 MAPK sur la Tyr182 entre 10 et 20 minutes d'ischémie chez les rats du groupe IPC *versus* le groupe témoin dans un modèle d'ischémie *ex vivo* selon Langendorff chez le lapin(24). Marais *et al.* ont aussi observé une élévation de la phosphorylation et de l'activité kinase de la p38 MAPK chez le rat dans un modèle d'ischémie *ex vivo* chez le groupe soumis à trois épisodes d'IPC(25). Ils rapportent que la p38 MAPK était déjà activée après le premier épisode d'IPC, et dans une moindre mesure après le deuxième, mais qu'elle n'avait pas été observée après le troisième épisode d'IPC. Pendant l'ischémie, ils ont rapporté, tant chez le groupe préconditionné que chez le groupe témoin, une élévation de l'activation de la p38 MAPK à 5 minutes d'ischémie qui a atteint un maximum à 15 minutes d'ischémie. Cependant, l'activation de la p38 était significativement plus faible chez le groupe préconditionné, comparativement au groupe témoin à 15 et 25 minutes d'ischémie. L'activation de la p38 MAPK décrite après 10 minutes de reperfusion a aussi été maintenue seulement chez le groupe témoin. Un autre groupe a observé que l'augmentation de l'activité de la p38 MAPK au début de l'ischémie était moins importante dans les cœurs préconditionnés que dans les cœurs témoins(26). Ils n'ont cependant pas évalué l'activité kinase de la p38 MAPK pendant ou après l'IPC. Lochner *et al.* ont confirmé l'élévation de

phosphorylation de la p38 MAPK après un épisode d'IPC, de même qu'après l'administration d'anisomycine, un activateur de la p38 MAPK(27). Ils ont aussi observé que l'élévation de la phosphorylation de la p38 MAPK observée pendant l'ischémie était plus faible dans le groupe IPC et celui traité avec l'anisomycine comparativement au groupe témoin. L'utilisation du SB203580, un inhibiteur de la p38 MAPK, pendant l'IPC a bloqué l'effet protecteur d'un épisode d'IPC alors qu'il n'a pu bloquer l'effet protecteur de trois épisodes d'IPC. L'utilisation du SB203580 au début de l'ischémie chez le groupe témoin a aussi eu un effet cardioprotecteur dans deux publications distinctes(26;27). Dans leur étude, Mocanu *et al.* rapportent que l'utilisation du SB203580 pendant l'IPC n'a pu bloquer l'effet cardioprotecteur, mais que son utilisation tout juste avant l'épisode d'ischémie a bloqué l'effet protecteur de l'IPC(28). L'utilisation du SB203580 avant l'ischémie chez le groupe témoin n'a eu aucun effet. Dans un modèle *in vivo* d'ischémie régionale chez le lapin, Iliodromitis *et al.* ont observé, pour leur part, une élévation de la phosphorylation de la p38 MAPK après 20 minutes d'ischémie chez le groupe préconditionné comparativement au groupe témoin(29).

L'apparente divergence entre certains de ces résultats portant sur l'activation de la p38 MAPK suite à l'ischémie et la reperfusion peut sembler surprenante, mais quelques points méritent d'être discutés afin d'éclaircir, en partie, ce problème scientifique. L'état de phosphorylation d'une kinase impliquée dans la signalisation intracellulaire, à un moment précis, est un indice de son activation, mais ne saurait être garant, à lui seul, de l'activité

kinase de ladite kinase, puisqu'une kinase phosphorylée n'est pas toujours une kinase active et que l'on ne peut extrapoler le degré d'activité enzymatique à un moment précis d'une expérience avec le seul résultat de l'état de phosphorylation de celle-ci. Cela dit, la plupart des manuscrits, et à plus forte raison des manuscrits ne traitant pas prioritairement de l'activité kinase, n'indiquent que cet état de phosphorylation, qui est beaucoup plus facile et rapide à mesurer, et qui reflète, généralement, l'état d'activation de la kinase. C'est pourquoi l'information portant sur l'état de phosphorylation d'une kinase à un moment précis d'un protocole d'ischémie reperfusion doit être interprétée avec soin pour ne pas extrapoler au-delà de ce que la rigueur scientifique permet. D'un autre côté, les essais kinases indiquent précisément, dans le temps, l'activité enzymatique de la kinase sur un substrat bien déterminé. En évaluant l'activité kinase sur un seul substrat, cette technique néglige peut être des substrats moins spécifiques pour la kinase à l'étude, ou l'une ou l'autre de ses isoformes. Ces deux techniques, de même que l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques, doivent donc être utilisées de façon concomitante, et avec les anticorps les plus sélectifs disponibles, afin d'obtenir les résultats les plus probants.

Nous savons que la p38 MAPK est, en fait, une famille d'isoformes (α , β , γ , δ) et que les anticorps commerciaux disponibles ne sont pas sélectifs pour l'une ou l'autre de ces isoformes. Ainsi, l'isoforme α , qui est généralement associée au phénomène d'apoptose et l'isoforme β , généralement associée à l'hypertrophie(30), peuvent vraisemblablement être activées à des moments différents, selon le stimulus approprié. Les isoformes α et β , de

même que l'isoforme γ , aussi appelée SAPK3, ont été identifiées dans le myocarde(31). Nous ne pouvons conclure, à savoir si la même isoforme subit deux phases de phosphorylation à des moments différents ou si deux isoformes distinctes sont activées conséquemment à des stimuli spécifiques. Liang *et al.* ont récemment publié une revue des résultats portant sur le rôle de la p38 MAPK dans l'hypertrophie cardiaque dans les modèles cellulaires et les animaux transgéniques(32). Encore une fois, l'IPC et l'ischémie elle-même étant des phénomènes transitoires, on doit être prudent lorsque l'on extrapole des résultats provenant d'animaux transgéniques exprimant un dominant négatif pour une isoforme de la p38 MAPK dans le tissu cardiaque puisque l'activation de la p38 MAPK par un stimulus protecteur comme l'IPC suit une cinétique cruciale pour la survie du muscle cardiaque.

Malgré certains résultats contradictoires, il apparaît que la p38 MAPK joue un rôle important dans le phénomène de l'IPC et dans le dommage résultant d'un épisode ischémique. Considérant l'ensemble des travaux cités, nous suggérons que l'activation d'une isoforme particulière de la p38 MAPK avant l'épisode ischémique, comme dans les protocoles d'IPC, entraîne une activation moindre d'une isoforme différente de la p38 MAPK en début d'ischémie conduisant à une diminution du dommage cardiaque subi par l'ischémie et la reperfusion. Une connaissance plus approfondie des différentes isoformes de la p38 MAPK ainsi que de leur cinétique d'activation et de leurs effecteurs pourrait grandement aider à solutionner ce problème.

1A.f) Implication du monoxyde d'azote (NO) et de la synthétase du monoxyde d'azote (NOS) dans l'ischémie, la reperfusion et le préconditionnement ischémique.

Les trois isoformes de la NOS, soit la NOS neuronale (nNOS, NOS-1), inducible (iNOS, NOS-2) et endothéliale (eNOS, NOS-3) et le monoxyde d'azote qu'elles produisent peuvent jouer un rôle protecteur ou délétère sur la survie des cardiomyocytes suite à un épisode ischémique. La mort des cardiomyocytes pendant la reperfusion est causée principalement par apoptose par opposition à la nécrose et l'ampleur de ce phénomène est intimement liée à la survie de l'organisme et à l'hypertrophie des cellules restantes conduisant à la progression vers l'insuffisance cardiaque(33). Les propriétés tant pro- qu'anti-apoptotiques du NO, ont fait l'objet d'une revue récente(34). Il a été rapporté que le TNF α pouvait causer l'apoptose via son récepteur TNFR et la voie associée aux récepteurs de mort cellulaire (*death receptor pathway*) par une activation de la caspase-8, l'induction de la iNOS et la production de NO(35). Même si une faible concentration de NO peut inhiber l'ouverture des pores mitochondriaux de transition et le relargage du cytochrome C, des concentrations supra physiologiques de NO (taux supérieurs à 2 μ M/sec) peuvent accélérer leur ouverture et faciliter la voie mitochondriale de l'apoptose, le relargage du cytochrome C et l'activation de la caspase-9(36). La NOS inducible est associée à l'inflammation et il a été démontré qu'elle augmente le stress oxydatif lorsqu'elle produit de fortes concentrations de NO(37).

Le monoxyde d'azote exerce aussi de nombreuses propriétés anti-apoptotique par divers mécanismes, parmi lesquels la *S*-nitrosylation de protéines clefs exécutrices dans l'apoptose, telles que la caspase-3 (Cys-163)(38) ou la protéine activatrice-1 (AP-1)(39) qui semblent les plus importantes, bien que ces phénomènes soient indépendants du GMPc. L'activation de la voie GMPc/PKG peut induire l'expression de la protéine Bcl-2, une protéine anti-apoptotique(34).

La quantité de NO produit, de même que son origine, semblent être des facteurs importants à considérer afin de prédire l'impact du NO sur la survie des cardiomyocytes. Des études sur des modèles *in vivo* plus pertinents seraient par conséquent nécessaires afin de mettre en contexte le rôle du NO produit dans ces modèles et s'assurer de travailler avec des concentrations de NO appropriées. Schulz *et al.* ont revu attentivement les études récentes traitant du rôle du NO dans la récupération fonctionnelle et le dommage post ischémique(40). La plupart d'entre elles concluent en décrivant un rôle protecteur du NO, endogène ou exogène, et en un rôle délétère des inhibiteurs de la synthèse du NO tant pour la récupération fonctionnelle que pour le dommage myocardique observé, bien que plusieurs divergences aient été rapportées(41).

Le rôle protecteur du NO dans l'IPC est, quant à lui, généralement accepté, particulièrement dans la deuxième fenêtre de l'IPC, depuis les travaux de Guo *et al.*(42), qui ont travaillé avec un modèle de souris invalidées (*knock out*) pour l'isoforme iNOS.

Dans leur étude, ils décrivent une induction de la protéine iNOS pendant la deuxième fenêtre de l'IPC et la disparition de l'effet protecteur pendant cette même deuxième fenêtre chez les souris iNOS^{-/-}. L'effet aigu de l'IPC chez ces souris iNOS^{-/-} est cependant resté inchangé. Lochner *et al.* ont aussi étudié le rôle du NO dans l'IPC et ont démontré qu'une perfusion de NNLA (50 µM) pendant l'IPC seulement pouvait empêcher l'effet protecteur de l'IPC et que trois courtes perfusions de SNP pouvaient mimer l'effet de l'IPC. Tant dans le groupe IPC que dans le groupe SNP, ils ont observé une élévation de la phosphorylation de la p38 MAPK avant l'ischémie comparativement au groupe témoin et une phosphorylation moindre pendant l'ischémie(43). Wang *et al.* ont étudié l'expression de la protéine iNOS dans les cœurs de souris soumis à un épisode d'IPC. Ils ont rapporté une induction de l'ARNm de iNOS (2 fois) une heure après l'IPC qui était maintenue pour 24 heures, et confirmé une induction de la protéine iNOS (2 fois) après 24 heures(44). Les types cellulaires ayant exprimé tant l'ARNm que la protéine sont les cardiomyocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses des gros vaisseaux alors que celles des petits vaisseaux et les fibroblastes n'ont pas exprimé de iNOS. Par opposition à ces résultats, une forte induction de l'ARNm de iNOS (6 fois après 48 heures) et de la protéine (3,5 fois après 66 heures) a été rapportée dans les cœurs soumis à une ligature permanente de l'artère coronaire descendante seulement dans les cellules inflammatoires infiltrées et non dans les cardiomyocytes survivants ou nécrotiques. L'élévation de la protéine iNOS a été encore supérieure (30 fois) lorsque les animaux ont été traités avec une endotoxine. Encore une fois, nous pouvons constater l'importance du degré d'induction de la protéine

iNOS et, en conséquence, des taux de NO produits, dans l'effet protecteur de l'IPC ou délétère de la réaction inflammatoire aiguë.

L'effet des cannabinoïdes sur la protéine NOS et la modulation de la synthèse du NO ont surtout été étudiés dans des domaines comme l'immunologie et les neurosciences. L'effet général rapporté est un effet inhibiteur des cannabinoïdes sur la synthèse de NO, tant par le récepteur CB1 que CB2(45-47). Il a par ailleurs déjà été proposé que les effets vasodilatateurs des cannabinoïdes, et particulièrement de l'anandamide, pourraient être liés à la production de NO via l'activation des NOS constitutives (nNOS et eNOS) par le récepteur CB1(48;49). Il a cependant été rapporté que la production de NO induite par l'anandamide dans les artères mésentériques était dépendante des récepteurs TRPV1(50).

1B. Pharmacologie des cannabinoïdes

1B.g) Identification et caractéristiques de certains endocannabinoïdes

La présence de récepteurs sélectifs pour les cannabinoïdes signifie que des composés endogènes existent et peuvent se lier à ces récepteurs. L'anandamide, (arachidonyléthanolamide ou AEA), un dérivé de l'acide arachidonique, a été le premier endocannabinoïde identifié à partir d'extrait de cerveau de porc(51). Le préfixe « ananda » provient du sanskrit et signifie « qui apporte la béatitude et une tranquillité intérieure ». Le 2-arachidonyl glycérol (2-AG) a ensuite été isolé à partir d'un intestin de chien(52) et identifié dans des cellules du tissu nerveux(53). Le 2-AG peut agir sur le récepteur CB1, mais lierait préférentiellement le récepteur CB2 et agirait comme un agoniste entier dont l'effet pourrait être inhibé par l'anandamide, qui agirait plutôt comme un agoniste partiel sur le récepteur CB2(54). D'autres dérivés d'acides gras ont été identifiés et caractérisés selon leur affinité pour l'un ou l'autre récepteur aux cannabinoïdes. Les composés *noladin ether* (2-arachidonyl glycéryl éther) avec un K_i de 20 nM pour le récepteur CB1(55) et oléamide, avec une affinité de l'ordre du micromolaire(56) seraient des agonistes CB1 entiers. La virodhamine (*O*-arachidonyl éthanolamine) posséderait, quant à elle, de faibles propriétés activatrices sur le récepteur CB1 qui pourraient être expliquées par sa conversion rapide en anandamide en milieu aqueux(57). D'autres éthanolamides d'acides gras tels l'oléoyléthanolamide (OEA), présentant des effets anorexigènes(57) et le

palmitoylethanolamide (PEA), connu depuis 1957 et possédant des propriétés anti-inflammatoires(58) sont aussi présentés comme des endocannabinoïdes. Cependant, la classification du PEA comme endocannabinoïde reste controversée puisque certains auteurs prétendent qu'il ne se lie pas aux récepteurs CB1 ou CB2(59) alors que d'autres le considèrent comme un agoniste CB2 endogène(60). Ses propriétés analgésiques et anti-inflammatoires seraient d'ailleurs renversées par le SR144528, un agoniste inverse pour le récepteur CB2(61). Il a récemment été proposé comme étant un ligand endogène du récepteur *peroxysome proliferator-activated receptor- α* PPAR α (62). Finalement, on le considère aussi comme un cannabinomimétique de par sa capacité à inhiber la *fatty acid amide hydrolase* (FAAH)(63-65), permettant ainsi d'augmenter le temps de demi-vie des autres endocannabinoïdes sujets à l'hydrolyse par cette enzyme.

1B.h) Synthèse des endocannabinoïdes et du PEA

La synthèse des endocannabinoïdes est effectuée par une réaction enzymatique assez simple et requiert des acides gras contenus dans les phospholipides de la membrane cellulaire. Les éthanolamides d'acides gras (anandamide, OEA et PEA) sont formés par le transfert d'un groupement acyl d'un phospholipide pour former un lien amide sur l'éthanolamine d'une molécule de phosphatidyléthanolamine par l'enzyme N-acyl-transférase (figure 3). Le N-acyl-phosphatidyléthanolamide ainsi formé reste emprisonné dans la membrane cellulaire afin que l'acyléthanolamide correspondant puisse être rapidement libéré dans la circulation par une cellule productrice d'endocannabinoïde suite à l'action de la phospholipase D stimulée par une élévation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} (58;66). La molécule de 2-AG est formée à partir d'une seule molécule phospholipidique, *sn*-1-acyl,2-arachidonyl-phosphatidylinositol (figure 4). La phospholipase C agit d'abord en produisant une molécule de diacylglycérol (DAG) à partir du précurseur phospholipidique et c'est l'action de la *sn*-1-DAG-lipase qui libère le 2-AG(58;66). La molécule de 2-AG peut être convertie en 1-AG, qui serait elle-même un peu moins efficace que le 2-AG pour se lier au récepteur CB2(66).

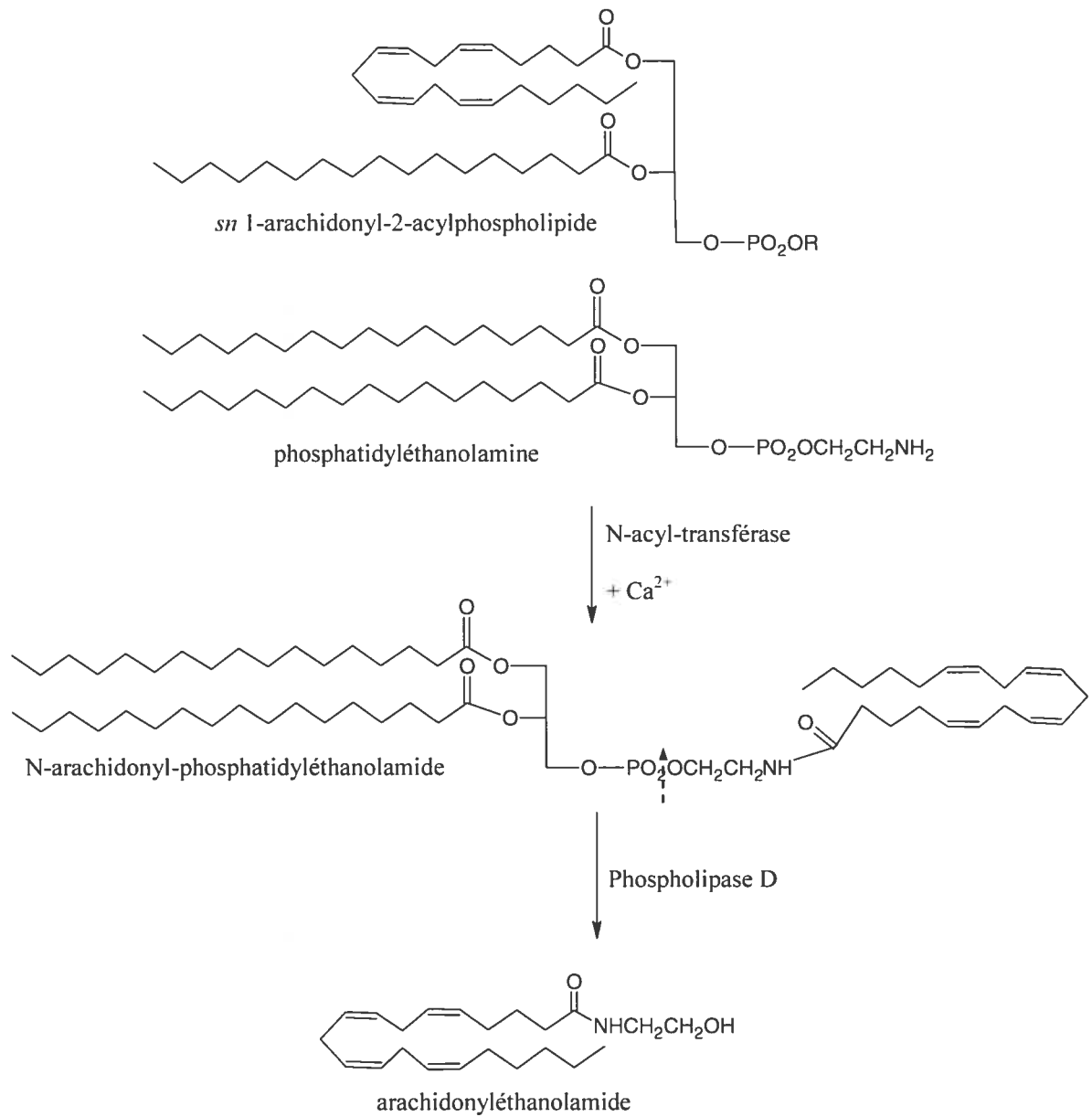


Figure 3. Schéma de la synthèse de l'anandamide (arachidonyléthanolamide, AEA) à partir de deux molécules phospholipidiques(58;66).

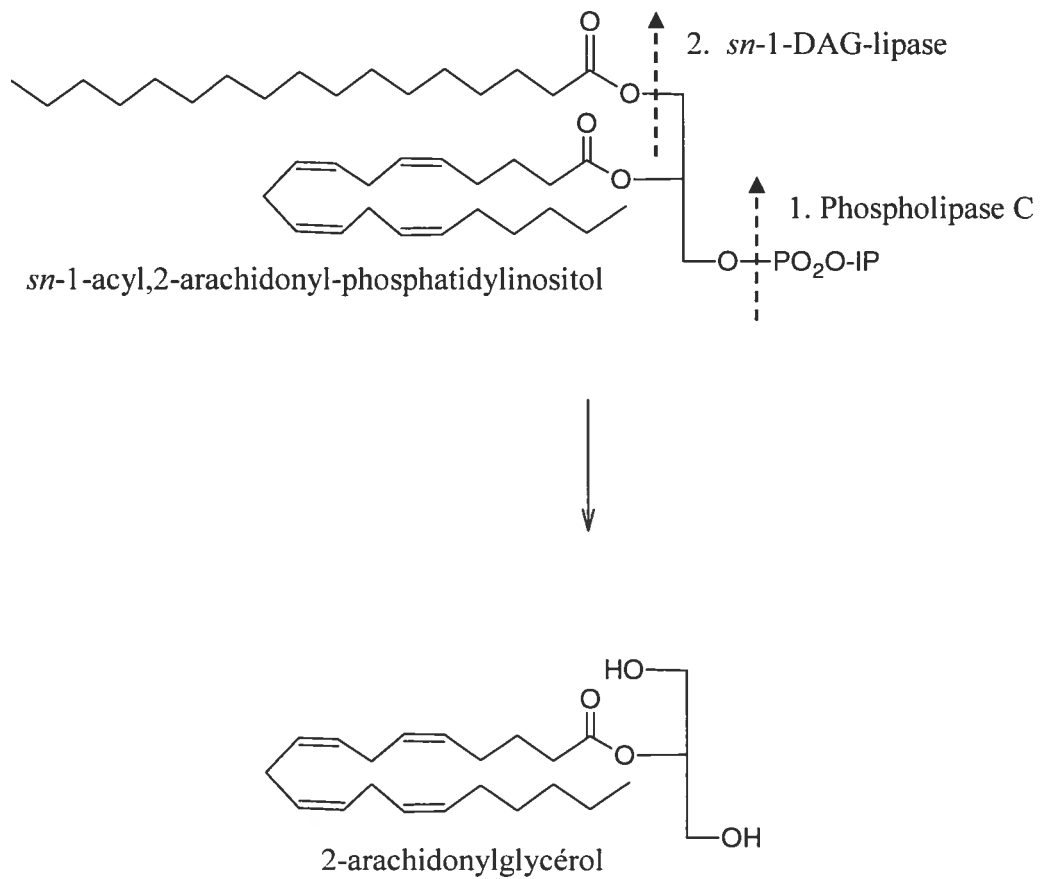


Figure 4. Schéma de la synthèse du 2-arachidonylglycérol (2-AG) à partir de la molécule phospholipidique précurseur(58;66).

Catabolisme des endocannabinoïdes

Nous avons mentionné précédemment l'enzyme FAAH et son rôle dans le catabolisme des endocannabinoïdes. Notons que préalablement à leur dégradation, les endocannabinoïdes sont internalisés dans la cellule par diffusion facilitée via des transporteurs encore mal caractérisés qui seraient saturables, sensibles à la température, mais insensible au sodium et spécifiques pour l'anandamide(67;68) ou le 2-AG(57). Un inhibiteur du transporteur de l'anandamide (AM404) a été développé(69) et est disponible sur le marché, mais manquerait de sélectivité puisqu'il pourrait aussi activer le récepteur TRPV1(70). Suite à son internalisation, l'hydrolyse de l'anandamide par la FAAH produit l'acide arachidonique et de l'éthanolamine(71;72). Plusieurs analogues de l'anandamide sont susceptibles à l'action de la FAAH comme l'arachidonyl-2'-chloroéthylamide (ACEA). Cependant, les composés ayant une fonction sur le carbone 1 ou le carbone 2 de l'éthanolamide, comme le méthananandamide, sont résistants à l'hydrolyse par cette enzyme(73). Le 2-AG peut aussi être hydrolysé par la FAAH, mais son catabolisme est surtout l'objet de la monoacylglycérol lipase (MAGL)(57;74). Récemment, une amidase impliqué dans l'hydrolyse sélective du PEA a été purifiée et caractérisée(75).

Récepteurs CB1 et CB2

Bien que l'usage récréationnel et médicinal du cannabis ait été établi il y a plusieurs siècles, l'identification des récepteurs cannabinoïdes est récente. Vers la fin des années 1980, Devane *et al.* ont décrit un site de liaison spécifique pour les cannabinoïdes dans une préparation membranaire de cerveau de rat(76). Deux ans plus tard, le premier récepteur cannabinoïde (CB1) a été identifié et cloné par Matsuda *et al.* à l'aide d'une librairie d'ADN complémentaires codant pour des récepteurs orphelins dans le cortex cérébral du rat(77). Munro *et al.* ont par la suite identifié un second récepteur (CB2) présent sur des cellules du système immunitaire et présentant un degré d'homologie de l'ordre de 44%(78), pavant ainsi la voie à une nouvelle famille de récepteurs qui font encore l'objet de nombreuses recherches et entretiennent l'espoir de traitements novateurs pour pallier aux maux grandissant de la société moderne occidentale.

Les tissus originels exprimant les récepteurs CB1 et CB2, soit le cortex cérébral et la rate, ont longtemps biaisé notre vision quant aux fonctions respectives des deux récepteurs en les confinant à un rôle psychomulateur ou immunosuppresseur. Les cannabinoïdes exercent cependant des effets hypotenseurs et chronotropes négatifs sur le système cardiovasculaire(79;80). Bien qu'il puisse être soutenu qu'une partie de ces effets soit une conséquence d'une inhibition centrale du tonus sympathique(80), il a été démontré que les cannabinoïdes endogènes ainsi que des agonistes synthétiques avaient des effets

vasodilatateurs directs(81). Nous présenterons ultérieurement nos résultats concernant la présence et la localisation des récepteurs CB1 et CB2 dans le ventricule de rat et discuterons de la problématique de la présence du récepteur CB2 dans le cœur qui a longtemps été controversée(58).

Les récepteurs CB1 et CB2 sont tous deux des récepteurs à sept passages transmembranaires qui sont couplés négativement à l'adénylate cyclase via une protéine Gi(58;82). Cependant, l'activation des deux sous-types a été associée tant à une élévation qu'à une diminution de l'activité enzymatique de l'adénylate cyclase et de la production d'AMPC(83). Dans leur étude, Rhee *et al.* ont démontré que l'activation des récepteurs CB1 ou CB2 inhibaient les isoformes I, V, VI, VIII de l'adénylate cyclase et stimulait les isoformes II, IV et VII. L'association de différents isoformes d'adénylate cyclase aux deux sous-types de récepteurs à l'intérieur d'un même tissu pourrait donc expliquer les effets antagonistes observés suite à l'activation des récepteurs CB1 ou CB2 dans une préparation d'oreillette isolée(84). Dans cette étude, Sterin-Borda *et al.* ont démontré que l'activation du récepteur CB1 dans une préparation d'oreillette de rat induisait une diminution de la production d'AMPc, une stimulation de la NOS, une augmentation des taux de GMPc et une diminution de la contractilité des oreillettes. Par opposition, l'activation des récepteurs CB2 a provoqué une hausse des taux d'AMPc et de la contractilité des oreillettes(84).

Il a été proposé que ces récepteurs existent sous trois états, soit R^0 , R^+ et R^- , et que la liaison d'un agoniste inverse pourrait induire une séquestration des protéines G_i , les empêchant ainsi de jouer leur rôle auprès d'autres récepteurs(85). Les deux récepteurs exercent une certaine activité basale constitutive pouvant être inhibée par des agonistes inverses pour le récepteur CB1 (SR141716A) ou CB2 (SR144528)(85;86). Le récepteur CB1 peut activer des canaux potassiques sensibles au voltage (I-A) via une inhibition de l'adénylate cyclase, effet sensible à la toxine pertussique(87), et inhiber les canaux calciques de type N et Q(58). Dans son état actif, il peut activer l'échangeur Na^+/H^+ via la voie ERK 1/2(88). Un rôle de l'échangeur Na^+/H^+ est d'augmenter le pH intracellulaire en réponse à l'acidification du cytoplasme rencontré entre autre durant les épisodes ischémiques où la cellule doit faire appel à la respiration anaérobie pour synthétiser l'ATP. On ne connaît pas l'importance de cette propriété du récepteur CB1 dans l'effet cardioprotecteur des cannabinoïdes envers les dommages ischémiques. Le niveau de phosphorylation basal de la ser-352 du récepteur CB2 humain transfecté dans des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) peut être induit par un traitement aigu avec un agoniste ou inhibé par un agoniste inverse et est inversement proportionnel à la quantité de récepteurs exprimés à la surface et à la réponse physiologique potentielle(89). Le phénomène de désensibilisation décrit ici est donc réversible suite à l'administration d'un antagoniste ou plus particulièrement d'un agoniste inverse. Nous discuterons de l'existence de nouveaux récepteurs cannabinoïdes tels que proposés dans la littérature dans une section ultérieure.

Voies de signalisation associées aux récepteurs CB1 et CB2

Bouaboula *et al.* ont étudié l'activation des kinases ERK 1/2 sur des lignées de cellules transfectées avec le récepteur CB1 ou CB2. L'agoniste non sélectif CP55940 a provoqué la phosphorylation et l'activation de ERK 1/2 et impliquerait une protéine G sensible à la toxine pertussique mais serait indépendante des taux d'AMPc dans chacune des deux lignées cellulaires(90;91). Les auteurs suggèrent un rôle de l'isoforme ϵ ou ζ de la PKC dans l'activation de ERK 1/2 par le récepteur CB2(91). Galve-Roperth *et al.* ont aussi décrit une activation de ERK 1/2, via la PI3K de classe IB, par le HU-210, un agoniste CB1, sur une lignée d'astrocytes humains(U373 MG)(92). L'activation du facteur de transcription AP1 par le 2-AG serait aussi observée suite à la phosphorylation de ERK 1/2, et non celle de JNK ou p38 MAPK, et impliquerait les deux sous-types de récepteur CB1 et CB2(93). Les cellules endothéliales vasculaires humaines, qui expriment le récepteur CB1, activeraient ERK 1/2, JNK et la p38 MAPK suite à un traitement avec l'anandamide(94). Une activation de la p38 MAPK dans l'hippocampe de rat a été rapportée suite au traitement avec des agonistes CB1 endogènes et synthétiques(95). Bien que le Δ^9 -THC ait stimulé la phosphorylation de ERK 1/2, JNK et p38 MAPK sur des cellules Jurkat, c'est l'activation de la p38 MAPK qui est responsable de l'induction de l'apoptose des cellules leucémiques par ce cannabinoïde et seul l'agoniste inverse CB2 (SR144528), contrairement à l'agoniste inverse CB1 (SR141716A) a inhibé cet effet(96). Le traitement d'une lignée de cellules gliales par le 2-AG a conduit à la prolifération cellulaire via le récepteur CB2 et

l'activation de la voie ERK 1/2(97). Les MAPK sont une famille de kinases impliquées dans une multitude de phénomènes physiologiques et pathologiques. Il n'est donc pas étonnant de constater qu'elles ont un rôle à jouer dans la pharmacologie des cannabinoïdes et dans leurs propriétés immunomodulatrices(98) ou leur contrôle de l'écoulement de l'humeur aqueuse dans l'oeil(99). Nous présenterons ultérieurement nos résultats traitant de l'implication des voies de signalisation intracellulaires comme la PKC et les MAPK dans l'effet cardioprotecteur des cannabinoïdes.

Effets vasodilatateurs des cannabinoïdes

Les effets hypotenseurs des cannabinoïdes ont été bien décrits, bien que certaines controverses persistent quant à la nature du récepteur impliqué dans ceux-ci. L'anandamide, le PEA et certains cannabinoïdes d'origine synthétique induisent une relaxation des artères mésentériques précontractées chez le rat(81). Cependant, alors que les effets vasorelaxants de l'anandamide sont bloqués par l'agoniste inverse SR141716A, ceux du PEA ne le sont pas, confirmant l'existence de différents mécanismes d'action(81). Wagner *et al.* rapportent des observations différentes et soutiennent que la vasodilatation des artères mésentériques par l'anandamide comporte une dimension dépendante de l'endothélium et que l'effet vasodilatateur sur les vaisseaux dénudés d'endothélium ne peut être bloqué par le SR141716A(100). Leurs travaux indiquent, de plus, que le WIN 55-212-2 et le HU-210, deux agonistes synthétiques, de même que le 2-AG, n'ont pu reproduire les effets vasodilatateurs de l'anandamide sur les préparations mésentériques intactes, suggérant l'existence d'un récepteur endothélial distinct du récepteur CB1, mais sensible à l'anandamide et au SR141716A(100). Le récepteur vanilloïde TRPV1 pour la capsaïcine semble un bon candidat pour remplir ce rôle puisqu'il lierait aussi l'anandamide et serait sensible à l'action du SR141716A(50;101). Dans une étude récente comparant l'effet vasorelaxant de l'anandamide sur les artères mésentériques de résistance (G3) et de conduction (G0), les auteurs concluent que la vasorelaxation observée dans les petites artères de résistance implique le récepteur TRPV1, le récepteur CB1 ainsi qu'un récepteur

endothélial couplé au facteur endothélial hyperpolarisant (*endothelium-derived hyperpolarizing factor*, EDHF)(102). Par opposition aux précédentes, la vasorelaxation des artères mésentériques de plus gros calibre serait indépendante de l'endothélium, mais impliquerait tout de même les récepteurs TRPV1 et CB1. Les deux récepteurs semblent impliqués dans cet effet de l'anandamide. Dans une étude récente, Pacher *et al.* ont montré clairement que l'anandamide pouvait induire une baisse de pression artérielle moyenne dans un modèle murin. Après une rapide baisse de pression de quelques secondes (phase 1), celle-ci a rapidement augmenté (phase 2) pour ensuite diminuer à nouveau (phase 3) sur une période d'environ 10 min(103). Les mesures de la contractilité ventriculaire ont suivi les mêmes variations que la pression artérielle. L'agoniste inverse SR141716A est resté sans effet sur les deux premières phases, mais a complètement inhibé troisième, soit la seconde baisse de pression, de même que la baisse de contractilité ventriculaire y étant associée. Chez les souris dont le récepteur TRPV1 avait été invalidé, les deux premières phases de variations ont été absentes alors que la baisse de pression prolongée a tout de même été observée, et inhibée par le SR141716A(103). De plus, il a déjà été rapporté que la perfusion de capsaïcine pouvait mimer les deux premières phases de variation de pression artérielle seulement chez les souris témoins comparativement aux souris dont le récepteur TRPV1 avait été invalidé(104). Les auteurs concluent que le récepteur TRPV est impliqué seulement dans les variations précoces de pression artérielle associée à l'anandamide, mais pas à la baisse de pression prolongée, qui elle, impliquerait le récepteur CB1. La perfusion d'anandamide ne cause pas de baisse de pression artérielle chez la souris

dont le récepteur CB1 a été invalidé(105;106) contrairement à ce qu'on observe chez la souris dont le récepteur TRPV1 a été invalidé(104). Cependant, il apparaît que l'anandamide peut causer une vasorelaxation sensible au SR141716A dans une préparation mésentérique chez les souris dont le récepteur CB1a été invalidé(105).

Le rôle des endocannabinoïdes dans la régulation de la pression artérielle est encore mal connu. Certaines observations suggèrent cependant qu'ils pourraient jouer un rôle dans certaines conditions pathologiques. Les lipopolysaccharides (LPS) peuvent augmenter les niveaux de 2-AG dans les plaquettes et d'anandamide dans les macrophages(107;108). Les endocannabinoïdes contribueraient aussi au phénomène d'hypotension observé lors d'hémorragie et de choc septique(109-111) de même que lors d'infarctus aigu du myocarde(112). Batkai *et al.* ont rapporté que l'inhibition de l'hypotension par le SR141716A suite à un choc septique n'impliquait cependant pas les récepteurs CB1 ou CB2 puisqu'ils ont observé la même hypotension chez les souris CB1^{-/-} de même que chez les souris CB1^{-/-} et CB2^{-/-}, toujours inhibée par le SR141716A alors que l'AM251 est resté sans effet(113).

Chez les rats SHR (*spontaneously hypertensive rat*), de même que dans deux autres modèles d'hypertension, l'anandamide ainsi qu'un inhibiteur de la FAAH (URB597) ont exercé un effet hypotenseur alors qu'ils sont restés sans effet chez les rats Wistar Kyoto (WKY)(114). Le SR141716A, ainsi que l'AM251 ont inhibé cet effet hypotenseur et

l'administration seule du SR141716A chez les rats SHR a même provoqué une élévation de la pression artérielle alors qu'il est aussi resté sans effet chez les WKY(114).

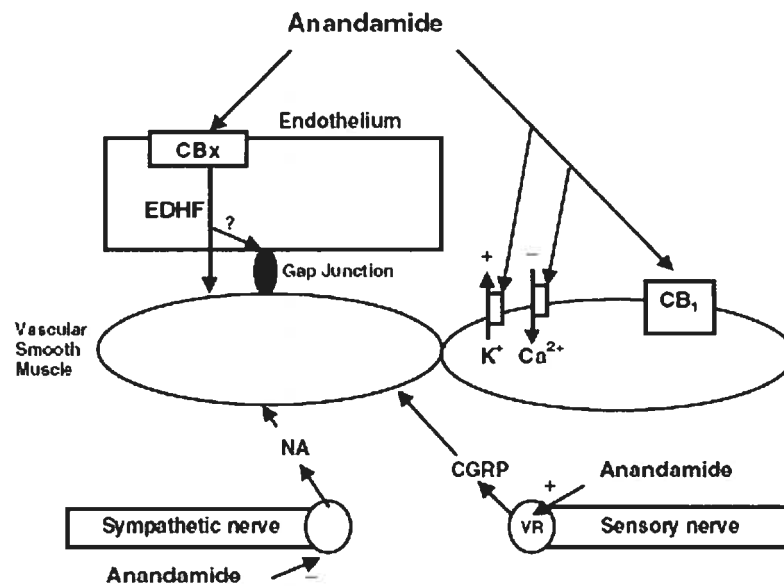


Figure 5. Diagramme illustrant les mécanismes possiblement impliqués dans la vasorelaxation induite par l'anandamide. Tiré de Randall *et al.* (115).

1B.m) Propriétés cardioprotectrices des cannabinoïdes

Par leur activité immunomodulatrice, les cannabinoïdes, via le récepteur CB2, devenaient d'excellents candidats pour étudier l'influence de la réaction inflammatoire sur le dommage cardiaque à la reperfusion.

La première allusion aux propriétés cardioprotectrices des cannabinoïdes a été publiée par Krylatov *et al.* qui ont observé des propriétés anti-arythmiques de l'agoniste non sélectif HU-210(116), un analogue très proche structuralement du Δ^9 -THC, et de l'anandamide(117).

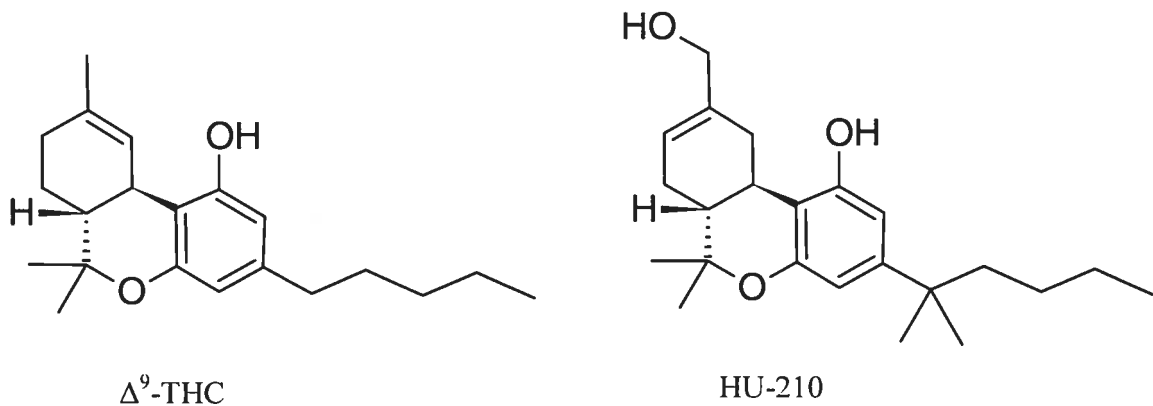


Figure 6. Formule chimique développée du Δ^9 -THC et du HU-210.

Dans notre laboratoire, Lagneux *et al.* ont par la suite établi un lien entre le récepteur CB2 et la cardioprotection conférée par un prétraitement de 24 heures avec le LPS(118). L'agoniste inverse SR144528, de même que l'inhibiteur de la synthèse du NO, le N-nitro-L-arginine (NNLA), ont bloqué la protection conférée par le LPS. Le SR144528 a aussi bloqué l'effet cardioprotecteur du nitroprussiate de sodium (SNP), un donneur de NO. L'agoniste inverse CB1 (SR141716A) est resté sans effet sur chacun des traitements cardioprotecteurs décrits. Notons le lien intéressant entre les cannabinoïdes, le LPS et le NO, qui se répète encore une fois. Dans une étude semblable, le SR144528 et le NNLA ont pu inhiber l'effet cardioprotecteur du choc thermique infligé 24 heures avant l'ischémie alors que le SR141716A est resté sans effet(119). D'autres équipes se sont depuis intéressées aux propriétés cardioprotectrices des cannabinoïdes et Di Filippo *et al.* ont publié des résultats confirmant nos observations dans un modèle *in vivo* d'ischémie régionale. Dans leur modèle, l'antagoniste/agoniste inverse CB2 l'AM630 a renversé les effets protecteurs du WIN 55212-2 alors que l'agoniste inverse CB1 l'AM251 est resté sans effet(120). Ils ont aussi démontré l'impact d'un agoniste non sélectif des récepteurs aux cannabinoïdes (WIN55212-2) sur les taux circulants d'IL-1 β et de CXCL8, une chimiokine impliquée dans le recrutement des neutrophiles chez les rongeurs. Ils ont d'ailleurs proposé un lien entre l'activation du récepteur CB2 et la baisse des cytokines susmentionnées observées dans l'étude(120). Lorsque administré seul, le AM630 a provoqué une aggravation du dommage cardiaque suite à l'ischémie et une augmentation des cytokines pro inflammatoires, suggérant un effet agoniste inverse.

Wagner *et al.* ont étudié l'implication des endocannabinoïdes dans l'hypotension observée lors d'un infarctus du myocarde. Ils ont décrit une augmentation de la mortalité causée par un prétraitement avec le SR141716A sans étudier l'effet d'aucun agoniste inverse CB2(112). Wagner *et al.* se sont ensuite intéressés à l'endothélium. Dans un modèle *in vivo*, ils ont étudié l'effet d'un traitement avec l'agoniste HU-210, initié 24 heures après la chirurgie, sur la fonction endothéliale évaluée à 12 semaines de reperfusion. Tout en étant bénéfique sur la fonction endothéliale, le traitement avec le HU-210 n'a pas altéré le taux de mortalité ou la taille de l'infarctus, mais rappelons que le traitement avec le HU-210 a débuté 24 heures après l'infarctus(121). Bouchard *et al.* ont aussi rapporté un effet protecteur, évalué à court terme, du 2-AG et du PEA sur la fonction endothéliale(122). Dans le modèle étudié, l'effet protecteur du PEA a été inhibé par l'un ou l'autre des deux agonistes inverses SR141716A ou SR144528 alors que l'effet protecteur du 2-AG a seulement été inhibé par le SR144528. L'effet protecteur du préconditionnement ischémique sur la fonction endothéliale a aussi été bloqué par les deux agonistes inverses.

2. Hypothèse et Objectifs du projet de recherche

Hypothèse : Considérant les résultats préliminaires obtenus au laboratoire décrivant les effets cardioprotecteurs des cannabinoïdes sur la fonction endothéliale suite à un épisode d'ischémie-reperfusion, nous proposons que les cannabinoïdes aient aussi un effet cardioprotecteur envers les dommages subis par le muscle cardiaque suite à un épisode d'ischémie reperfusion tant *in vivo* qu'*ex vivo*. Nous proposons que cet effet cardioprotecteur implique l'activation de voies de signalisation similaires à celles impliquées dans le phénomène du préconditionnement ischémique.

Objectifs :

- Identifier et localiser au niveau du système cardiovasculaire les deux sous-types de récepteurs cannabinoïdes (CB1 et CB2).
- Définir l'implication relative des deux sous-types dans l'effet cardioprotecteur à l'aide d'agonistes et d'agonistes inverses sélectifs pour les récepteurs CB1 et CB2.
- Identifier les voies de signalisation (MAPK) impliquées dans cet effet cardioprotecteur et déterminer parmi celles-ci lesquelles sont préférentiellement activées par les agonistes sélectifs
- Identifier des effecteurs (NO) pouvant être stimulés par les agonistes cannabiques et déterminer leurs rôles dans l'effet protecteur décrit.
- Confirmer l'effet protecteur des cannabinoïdes dans un modèle *in vivo* d'ischémie cardiaque.

3. Matériels et Méthodes

Toutes les expériences animales rapportées dans la présente thèse ont été effectuées conformément aux directives du conseil canadien de protection des animaux. Les protocoles décrits ont, pour leur part, été préalablement approuvés par le CDEA et le nombre d'animaux utilisés a aussi été justifié et approuvé par le comité susmentionné. Philippe Lépicier est détenteur d'un certificat confirmant ses capacités à manipuler les animaux de laboratoire avec toutes les précautions nécessaires et a complété le module de formation pratique pour l'espèce *rattus norvegicus*. La souche animale Sprague-Dawley a été utilisée pour l'ensemble des expériences et des animaux mâles pesant entre 300 et 350 grammes ont été fournis par les laboratoires Charles River.

3.a) Modèle *ex vivo* de perfusion du cœur selon Langendorff

Le modèle de rétroperfusion de cœur isolé a été décrit pour la première fois par Langendorff en 1895(123). Le modèle selon Langendorff que nous avons utilisé était muni d'une pompe péristaltique assurant la perfusion constante du tampon Krebs-Henseleit et celle-ci pouvait être ajustée afin d'obtenir le débit de perfusion souhaité lors des différents protocoles décrits. Ce système est donc dit à perfusion à débit constant, par opposition aux modèles utilisant la force de la gravité entre le réservoir et la canule aortique pour assurer une perfusion à pression constante. Le tampon de perfusion Krebs-Henseleit était composé de NaCl 118 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 2,5 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1 mM, NaHCO₃ 24 mM, D-glucose 5 mM et du pyruvate de sodium 2 mM. Il était maintenu à 37°C dans un réservoir chauffé à l'aide d'une double paroi dans laquelle circule de l'eau distillée chauffée à 37°C. Il est à noter qu'une petite quantité de sulfate de cuivre (environ 5 mg) a été ajoutée au réservoir contenant l'eau distillée en circulation fermée afin de réduire la formation d'algues dans les conduits. Le tampon était oxygéné par des bulleurs reliés à une bombonne contenant 95% d'O₂ et 5 % de CO₂ (Praxair Qc). L'apport constant d'une petite quantité de CO₂ au tampon était suffisant pour maintenir un pH constant assuré par les ions bicarbonate et phosphate. En effet, la formation et l'évaporation du CO₂ par la dégradation de l'ion bicarbonate aurait pu entraîner une alcalinisation du tampon.



Les animaux ont d'abord été soumis à une narcose à l'aide d'une cloche sur laquelle a été fixé un apport en CO_2 fourni par une bombonne contenant 100% de CO_2 (Praxair, Qc). Les animaux ainsi endormis ont été euthanasiés à l'aide d'une guillotine adaptée pour les rongeurs de la taille des rats et le cœur a été prélevé suite à une incision sous-sternale suivie d'une coupe du diaphragme. L'expérimentateur a porté une attention particulière à préserver une partie suffisante de l'aorte (minimum de 3 mm) afin de pouvoir installer correctement le cœur sur le modèle selon Langendorff. Le cœur ainsi prélevé a été immergé dans une solution à 4°C de Krebs-Henseleit héparinée (~ 70 UI/ml) puis transporté vers le modèle de Langendorff pour y être fixé. L'aorte a été fixée sur la canule aortique à l'aide d'une pince alligator et d'une soie chirurgicale de grosseur 4-0. Le débit de la rétroperfusion a été fixé à 15 ml/min et ajusté à la baisse pendant la période de stabilisation ($10 \text{ ml/min} < \text{débit} < 15 \text{ ml/min}$) si la pression de perfusion était supérieure à 100 mm Hg.

Un transducteur de pression relié à un polygraphe (Modèle 79 de Grass) enregistrait la pression de perfusion tout au long de l'expérience. Un deuxième transducteur de pression était relié à un ballonnet qui était lui-même inséré dans le ventricule gauche afin de mesurer les variations de pression intra ventriculaire (pression systolique et diastolique). La première dérivée de la pression intra ventriculaire en fonction du temps était aussi enregistrée afin de déterminer la vitesse de contractilité cardiaque (dP/dt^+) et la compliance ventriculaire (dP/dt^-). La pression intra ventriculaire diastolique était ajustée entre 10 et 15

mm Hg au début de l'expérience et réajustée au besoin pendant la période de stabilisation. Les valeurs de contractilité cardiaque (dP/dt^+), de compliance ventriculaire (dP/dt^-), de pression diastolique ventriculaire gauche (LVDP) et de résistance coronaire, sont les paramètres permettant l'analyse de la récupération fonctionnelle dans le modèle *ex vivo*.

$$R_{cor} (mmHg \cdot g \cdot \min / ml) = \frac{P_{perf} (mmHg) \cdot M (g)}{D (ml / \min)}$$

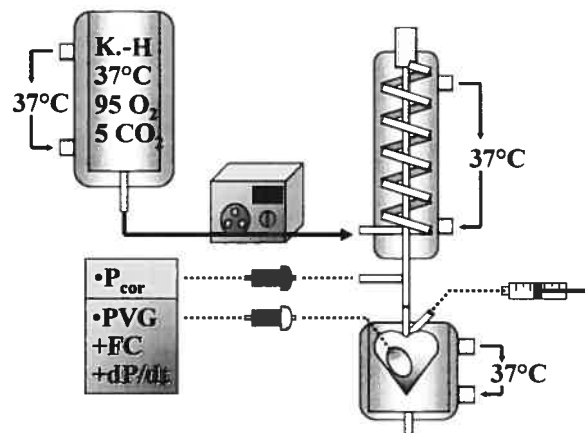


Figure 7. Schéma du modèle de perfusion selon Langendorff utilisée pour le protocole d'ischémie *ex vivo*.

Le modèle d'ischémie choisi en était un d'ischémie globale partielle suite à une diminution du débit de perfusion entre 0,4 et 0,6 ml/min pour une période variant entre 90 et 120 minutes dans les expériences décrites. Le retour au débit pré ischémique signifiait le début de la reperfusion qui durait entre 20 et 60 minutes selon les expériences décrites. Une période de reperfusion de 60 minutes est nécessaire afin de pouvoir mesurer la taille de l'infarctus selon le protocole de coloration au chlorure de triphenyl-tetrazolium (TTC) tel que décrit plus tard dans la méthodologie. Pour les expériences mesurant uniquement la récupération fonctionnelle du myocarde, une période de reperfusion de 20 minutes a été jugée suffisante. Le modèle global d'ischémie partielle choisi offre l'avantage de permettre une perfusion constante des agonistes et/ou antagonistes pharmacologique durant toute la durée de l'ischémie à l'intérieure de la zone à risque, par opposition au modèle d'ischémie globale complète (débit de perfusion de 0 ml/min) ou d'ischémie régionale complète (ligature temporaire de l'artère coronaire inter ventriculaire gauche).

La perfusion des agonistes et des antagonistes propres à chaque étude était effectuée à l'aide d'un pousse-seringue (modèle 11, Harvard Apparatus, Montreal, Canada) à 1/100 du débit de perfusion de la pompe péristaltique. Il est à noter qu'une seringue de petit diamètre, généralement 3 ml, était nécessaire afin d'obtenir une vitesse du pousse seringue suffisante pour avoir un débit à peu près constant pendant l'ischémie ($d \sim 0,3$ ml/h) et ainsi éviter une perfusion de type *boli* successifs accompagnant nécessairement une seringue de

grand diamètre puisque pour un débit prédéterminé, la vitesse du pousse-seringue est inversement proportionnelle au carré du rayon de la seringue.

$$\text{débit}_{\text{pousse-seringue}} \text{ ml/min} = \pi (\text{diamètre de seringue cm} / 2)^2 \cdot \text{vit}_{\text{pousse-seringue}} \text{ cm/min}$$

Les concentrations de principes actifs mentionnées dans les protocoles expérimentaux font référence à la concentration finale présente dans le tampon de perfusion. Le débit de perfusion du pousse-seringue étant de l'ordre d'un centième du débit de perfusion coronaire, les concentrations de principe actif dans la seringue correspondent à 100 fois la concentration finale souhaitée.

3.b) Modèle d'ischémie *in vivo*

Le modèle d'ischémie *in vivo* présenté ici est une adaptation de celui préalablement décrit par Lamontagne *et al.* en 1989(124). De par son caractère plus global, ce modèle étudie l'ischémie cardiaque en tenant compte de tous les systèmes et de l'organisme entier. Il se veut donc une approche plus près de la situation clinique sous-jacente, c'est-à-dire la maladie ischémique cardiaque et plus particulièrement l'infarctus du myocarde.

Les rats ont été anesthésiés avec du pentobarbital sodique (don du Dr Yamaguchi, faculté de pharmacie) en injection intra péritonéale à une dose de 65 mg/kg. Les animaux étaient ensuite installés en décubitus dorsal sur une table de chirurgie munie d'un coussin chauffant et d'un piqué médical. Un tube de polyéthylène de calibre 90 (PE90), relié à un ventilateur mécanique pour petits animaux, a été inséré dans la trachée pour ventiler l'animal à raison de 70 à 90 respirations par minute et pour un volume d'environ 7,5 ml. La fréquence respiratoire pouvait être ajustée légèrement à la hausse si une cyanose des extrémités était observée ou si l'animal présentait des spasmes thoraciques reflétant une activation du réflexe respiratoire rachidien. Une voie veineuse était, par la suite, installée dans la veine pénienne à l'aide d'un cathéter de calibre PE50 contenant une solution de normal salin (NaCl 0,9%) héparinée (200 UI/ml). Cette voie était par la suite utilisée pour effectuer l'administration IV des principes actifs et des doses de pentobarbital supplémentaires nécessaires au maintien de l'anesthésie. Généralement, une dose d'environ

15 mg/kg de pentobarbital était nécessaire environ 120 minutes après le début du protocole. Des électrodes étaient installées sur l'axe DIII (membre supérieur gauche et membre postérieur droit) de même qu'une mise à la terre sur le côté droit de l'animal. L'électrocardiogramme (ECG) était enregistré sur un ordinateur pour toute la durée de l'expérience avec le logiciel Acknowledge 3.5 à une fréquence d'échantillonnage de 50 Hertz. La carotide droite était dégagée et canulée avec un cathéter de calibre PE50 contenant la solution saline héparinée préalablement décrite et le cathéter était rincé avec ladite solution pour éviter la coagulation sanguine à l'intérieur dudit cathéter. Ce dernier était relié à un transducteur de pression aussi relié à l'ordinateur avec la même interface d'acquisition et la pression artérielle était donc surveillée et enregistrée pendant toute la durée de l'expérience.

Une thoracotomie gauche était effectuée. Tout d'abord, un espace suffisant (environ 3-4 cm²) était aménagé, la fourrure enlevée et les muscles intercostaux dégagés, puis coupés. Une incision entre les côtes à environ 3 cm du membre supérieur gauche a été réalisée à l'aide d'une pince hémostatique puis élargie en suivant le trajet intercostal. Un écarteur était installé et ouvert pour dégager un espace suffisant pour identifier l'artère coronaire interventriculaire gauche située juste à côté de l'oreillette gauche. Une soie chirurgicale de calibre 4-0, fixée à une aiguille courbe, était passée sous l'artère susmentionnée à l'aide d'un porte-aiguille ophtalmique. Les deux extrémités de la soie étaient passées dans un cylindre rigide et une micro pince hémostatique fixée à l'extrémité distale du cylindre

permettait d'exercer une ligature temporaire de l'artère. Suite à cette ligature, la région soumise à l'ischémie affichait rapidement une coloration plus foncée et la présence d'arythmies était visible sur le moniteur dans les cinq premières minutes suivant la procédure. La micro pince hémostatique était relâchée après 30 minutes d'ischémie et la région ischémisée était reperfusée pour 60 minutes.

À la suite de cette reperfusion, le cœur était prélevé et installé sur un modèle de perfusion selon Langendorff tel que décrit précédemment et perfusé pour environ 5 minutes. La ligature était ensuite resserrée de façon permanente et une solution de bleu d'Evans (0,5% bleu d'Evans dans du normal salin) était perfusée pour colorer la zone non soumise à l'ischémie partielle. La taille de l'infarctus en fonction de la zone à risque pouvait ensuite être mesurée selon un protocole décrit ultérieurement.

La mesure des arythmies était effectuée à l'aide du logiciel Acknowledge 3.5 avec lequel il est possible d'évaluer la période temporelle pendant laquelle des arythmies avaient lieu. Celles-ci ont donc été évaluées considérant leur durée ainsi que leur sévérité en suivant une échelle qualitative pour chaque expérience. Tous les cœurs ont été classés dans l'une des catégories suivante : 1) aucun épisode de tachycardie ventriculaire 2) au moins un épisode de tachycardie ventriculaire 3) au moins un épisode de fibrillation ventriculaire réversible ou 4) épisode de fibrillation ventriculaire non réversible mortelle.

3.c) Taille de l'infarctus et évaluation de la zone à risque

La taille de l'infarctus a été déterminée par coloration avec une solution à 1% de chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (TTC) dans un tampon Tris 200 mM à pH 7,8 après une période de reperfusion de 60 minutes suivant l'ischémie. Six à sept tranches de cœurs ont été incubées pendant 5 minutes dans une solution de TTC à 1% à 37°C et ensuite immergées dans une solution de formaldéhyde à 10%. Les coupes ont été numérisées et la taille de l'infarctus a été mesurée par le rapport entre la zone nécrotique blanche et la zone saine en rouge représentant la zone à risque avec le logiciel *Image J 1.34s* fourni par le *NIH*. La zone à risque dans le cadre d'une ischémie globale est l'entièreté du myocarde alors que dans le cadre d'une ischémie régionale, elle doit être évaluée, comme cela a été fait, par une coloration, par exemple au bleu d'Evans.

3.d) Extraction des protéines

Les coeurs desquels on a extrait des protéines pour effectuer le protocole d'immunobuvardage ont été découpés en morceaux puis immergés dans l'azote liquide à différents moments dans le protocole d'ischémie reperfusion et ultérieurement réduits en poudre avec un pilon dans un mortier avec de la glace sèche et de l'azote liquide et conservés à -80°C. Les échantillons ont ensuite été homogénéisés à l'aide d'un polytron à vitesse maximale pour 10 sec dans un tampon de lyse. Différents tampons de lyse ont été utilisés durant les manipulations décrites.

Le tampon de lyse A était composé de : Tris (pH 7,5) 20 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, β -glycérophosphate 1 mM, NaCl 150 mM, vanadate de sodium 1 mM, pyrophosphate de sodium 2,5 mM, $MgCl_2$ 4,5 mM, 1,4-dithiothreitol (DTT) 0,5 mM, fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) 1 mM, Triton X-100 1% et de leupeptin 1 $\mu g\ ml^{-1}$. On a utilisé ce tampon dans le cours des expériences visant à identifier la phosphorylation des différentes MAPK suite au traitement avec le PEA et celles conduisant à l'identification des récepteurs cannabinoïdes.

Le tampon de lyse B, quant à lui, était composé de Tris (pH 7,4) 50 mM, EDTA 5 mM, β -glycérophosphate 40 mM, NaCl 150 mM, vanadate de sodium 1 mM, NaF 50 mM, glycérol 10%, Triton X-100 1%, PMSF 0,2 mM, pepstatin A 1 $\mu g\ ml^{-1}$, aprotinine 2 $\mu g\ ml^{-1}$ et de

leupeptine 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Ce tampon a été préféré au précédent pour les expériences subséquentes, soit pour déterminer la phosphorylation des MAPK suite aux différents traitements avec les agonistes sélectifs et pour les expériences au sujet des protéines de choc thermique (HSP27 et HSP70). Sa plus grande capacité d'inhibition des protéases de même que l'absence d'EGTA, qui peut altérer l'essai de quantification au BCA, ont justifié notre choix.

Le tampon de lyse C, utilisé dans le protocole de précipitation de la protéine iNOS, était composé de Tris (pH 7,5) 50 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, 1,4-dithiothreitol 1 mM, NaF 50 mM, pyrophosphate de sodium 5 mM, PMSF 1 mM, glycérol 10%, Triton X-100 1% et d'un cocktail d'inhibiteurs des protéases (Sigma #P8340).

Les échantillons étaient par la suite déposés sur glace pour 30 minutes et le surnageant transféré dans des eppendorfs pour être centrifugé pendant 30 minutes à une vitesse de 12 000 rpm et à une température de 4°C. Les extraits de protéines ainsi obtenus étaient séparés en aliquots de 50 μl et conservés à -80°C. La quantification subséquente des protéines était effectuée à l'aide de la technique de l'acide bicinchonique (BCA, Pierce, Rockford, IL). Brièvement, cette technique de quantification colorimétrique fait appel à la réduction du cation cuprique (Cu^{2+}) en cation cupreux (Cu^{+}) par un lien peptidique. Le complexe formé de deux molécules d'acide bicinchonique et d'un cation cupreux prend alors la coloration pourpre absorbant à 562 nm. Une courbe étalon avec une protéine standard, par exemple l'albumine bovine (BSA), doit toujours être effectuée pour les fins

de quantification et l'absorbance des échantillons doit être ajustée à la baisse en fonction de l'absorption du tampon de lyse seul pour une meilleure quantification. Comme avec toute courbe étalon, une extrapolation n'est pas souhaitable, on préférera diluer les échantillons à quantifier dans du tampon de lyse pour obtenir une absorbance située à l'intérieur de la courbe de calibration.

3.e) Immunobuvardage

Les extraits de protéines (20 μ g) ont été mélangés avec du tampon de Laemmli, bouilli à 100°C pour 5 minutes et déposés sur un gel de polyacrilamide 10% contenant 0,1% de SDS. Il est à noter que les échantillons ayant servis à identifier les récepteurs CB1 et CB2 n'ont pas été bouillis, mais laissés pour 60 minutes à température ambiante avant d'être déposés sur le gel. Une différence de potentiel de 100 volts a entraîné les protéines sur le gel par leur gradient électrique et les a séparées en fonction de leur poids moléculaire. L'ajout d'un marqueur de poids moléculaire à la place d'un des échantillons à l'étude a permis une approximation du poids moléculaire des protéines d'intérêt. Les protéines du gel ont ensuite été transférées selon un protocole modifié de Towbin *et al.* pendant toute la nuit à 4°C sur une membrane de nitrocellulose supportée à l'aide d'un appareil à transfert de type Western(125). Après avoir saturé les liaisons protéines protéines non spécifiques avec une solution de lait en poudre 5 % p/v dans un tampon TTBS, les membranes étaient incubées pour la nuit, à 4°C, dans une solution contenant l'anticorps sélectionné. Un tableau contenant les anticorps utilisés est fourni ultérieurement. Les protéines d'intérêt ont pu être révélées grâce à des anticorps commerciaux sélectifs et phosphospécifiques le cas échéant et les anticorps secondaires appropriés. Les membranes ont été lavées dans du tampon TTBS. Tous les anticorps secondaires utilisés étaient couplés avec de la peroxydase de raifort (horseradish peroxydase) et l'ajout d'une solution d'ECL (Amersham) ou de Chemiglow (Alpha Innotech). L'enzyme étant présente sur l'anticorps secondaire, il suffit

d'ajouter une solution contenant du peroxyde et un réactif quelconque pouvant être oxydé et ainsi émettre une longueur d'onde dans le spectre visible. On comprend que l'enzyme étant un catalyseur, la solution ne peut être préparée longtemps à l'avance puisqu'une partie de la réaction pourrait avoir été déjà consommée.



Les anticorps de certaines membranes ont par la suite été décollés grâce à une solution adéquate (*stripping buffer*) et une deuxième série d'anticorps primaire, de source différente, a pu être appliquée afin d'apprécier l'expression, par exemple, de la forme non-phosphorylée de la protéine d'intérêt. Cette manipulation a été effectuée à 60 °C pour 30 minutes en immergeant la membrane dans un tampon composé de Tris (pH 6,8) 62,5 mM, SDS 2%, et β-mercaptoéthanol 100 mM. La quantité de protéine a été évaluée à l'aide d'un appareil Chemilmager 5500 (Alpha Innotech Corporation San Leandro, CA) en fonction de l'intensité lumineuse mesurée.

Tableau 1. Liste des anticorps utilisés pour les expériences décrites dans la présente thèse.

Protéine d'intérêt	fournisseur	# de catalogue	Source de l'anticorps	Dilution	Note particulière
Récepteur CB1	Calbiochem	# 209550	lapin polyclonal	1 :1000 BSA 5%	77 aa (N-terminal)
Récepteur CB1	Santa Cruz Biotechnology	sc-10066 (N-15)	chèvre polyclonal	1 :1000 lait 5%	N-terminal protéine humaine
Récepteur CB2	Calbiochem	# 209554	lapin polyclonal	1 :1000 BSA 5%	32 aa (N-terminal)
Récepteur CB2	ABR	#PA1-746	lapin polyclonal	1 :1000 lait 5%	32 aa (N-term) de la protéine du rat
troponine T-C	Santa Cruz	sc-8121	chèvre polyclonal	1 : 50	épitope C-terminal protéine humaine
p38 MAPK	New England Biolab, Beverley, MA, USA	NEB #9212	lapin polyclonal	1 :1000 lait 5%	phospho-Tyr/Thr (180/182)
phospho- p38 MAPK		NEB #9216	souris monoclonal	1 :1000 BSA 5%	
p44/42 MAPK	New England Biolab, Beverley, MA, USA	NEB #9102	lapin polyclonal	1 :1000 lait 5%	
phospho- p44/42 MAPK		NEB #9106	souris monoclonal	1 :1000 BSA 5%	
JNK MAPK	New England Biolab, Beverley, MA, USA	NEB #9252	lapin polyclonal	1 :1000 lait 5%	
phospho- JNK MAPK		NEB #9255	souris monoclonal	1 :1000 lait 5%	
iNOS	BD Transduction laboratory	#610328	souris monoclonal	1 :500 lait 5%	aa 961-1144 du peptide murin. réactivité croisée avec le rat confirmé
HSP27	Santa Cruz Biotechnology	sc-1049	chèvre polyclonal	1 :1000 lait 5%	C-terminal
phospho- HSP27	New England Biolab, Beverley, MA, USA	NEB #2401	lapin polyclonal	1 :1000 BSA 5%	Ser-82
HSP70	Santa Cruz Biotechnology	sc-24	souris monoclonal	1 :2000 lait 5%	

3.f) Précipitation de la protéine NO synthétase inductible (iNOS)

Nous avons utilisé des billes de 2'5'-ADP-Sépharose 4B (Amersham #17-0700-01, Piscataway, NJ) qui se lient au domaine dépendant du NADPH des isoformes de la protéines NO synthétase tel que décrit par Perreault *et al.*(126) Après avoir lavé les billes avec le tampon de lyse adéquat, nous avons incubé 3 mg d'extrait de protéine à une solution de 20 µl de billes pour 3 heures à température de la pièce sous agitation constante. Nous avons ensuite prélevé les billes et les avons lavées avec un tampon PBS (pH 7,4) et les avons remise en suspension dans un tampon Laemmli 2X. Nous avons déposé 20 µl de supernageant sur un gel de polyacrilamide à 6% contenant 0,1% de SDS. Nous avons utilisé un anticorps monoclonal anti-iNOS (BD Transduction laboratory #610328; Mississauga, ON) à une dilution de 1:500 dans une solution à 5% p/v de lait en poudre dans du TTBS. La technique de précipitation par affinité permet une concentration de la protéine d'intérêt dans le surnageant, mais ne devrait pas être assimilée à une immunoprécipitation, qui est beaucoup plus sélective.

3.g) Essai kinase *in vitro*

L'activité kinase des protéines ERK1 et p38 a été quantifiée suite à la mesure du transfert de phosphate radioactif sur les substrats spécifiques aux kinases susmentionnées, respectivement la protéine basale de la myéline (MBP) et le facteur de transcription ATF2 lié au glutathion *S* transférase (GST-ATF2) (127;128). Brièvement, nous avons immunoprécipité les extraits de protéines (500 µg pour ERK1 et 1 mg pour p38) avec 2 µL d'antisérum ERK1 (SM1) ou 5 µL d'antisérum p38 (HSK 591.1) précouplé à des billes de sépharose liées à la protéine A pour la nuit à 4°C. Le complexe immun contenant ERK1 a été lavé 3 fois avec un tampon de lyse contenant du Triton X-100 et une fois avec le tampon de la kinase ERK1 (HEPES 20 mM pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, PNPP 10 mM, DTT 1 mM). L'activité kinase sur MBP a été évaluée en resuspendant les billes dans un volume total de 40 µL de tampon kinase (MBP 0,25mg/mL, ATP 50 µM et 5 µCi [γ -³²P]ATP). L'activité enzymatique de p38 a été évaluée de la même manière à l'exception du dernier lavage effectué avec un tampon kinase p38 (HEPES 20 mM pH 7,4, β -glycérophosphate 20 mM, MgCl₂ 20 mM, DTT 2 mM et orthovanadate sodique 0,1 mM). Les billes ont été resuspendues dans 40 µL d'un tampon p38 kinase (GST-ATF2 1-96 0,075 mg/ml (Santa Cruz Biotechnology), ATP 50 µM, et 25 µCi [γ -³²P]ATP). Les réactions de transfert de phosphate par ERK1 ou p38 ont été initiées par l'ajout d'ATP. Une période d'incubation de 15 minutes à 30°C a été allouée et les réactions ont été arrêtées par l'ajout d'un tampon dénaturant 5X. Les échantillons ont été analysés par électrophorèse sur un gel de

polyacrylamide à 15% contenant du SDS et les bandes correspondant au MBP et au GST-ATF2 ont été découpées pour permettre le comptage ultérieur de la radioactivité. L'activité kinase des protéines est exprimée en picomoles de phosphate incorporé au substrat par minute et par microgramme d'extrait de protéine initiale. L'antisérum anti-ERK1 (SM1) de même que l'antisérum anti-p38 (HSK 591.1) ont été de généreux dons du Dr Sylvain Meloche (Département de Pharmacologie, Université de Montréal).

3.h) Immunohistochimie

Les cœurs utilisés pour effectuer ces expériences ont été installés sur le modèle de Langendorff pour 5 minutes ou soumis à un protocole complet d'ischémie reperfusion. Ils ont par la suite été fixés dans une solution à 10% de formaline dans un tampon PBS et traités conformément aux procédures histologiques standards. Les cœurs ont été coupés en sections longitudinales de 6 μm , déparaffinisés dans des bains de xylène et d'éthanol et l'activité peroxydase endogène a été neutralisée dans une solution contenant 200 ml de méthanol et 50 ml de peroxyde d'hydrogène à 30%. Les liaisons non spécifiques des anticorps primaires ont été prévenues en incubant préalablement les tissus dans une solution contenant 5% de sérum provenant des espèces utilisés pour développer les anticorps secondaires respectifs. Les sections de cœur ont ensuite été exposées à l'anticorps primaire pour 60 minutes. Un anticorps polyclonal de chèvre développé contre la protéine CB1 humaine de Santa Cruz et un anticorps polyclonal de lapin développé contre la protéine CB2 de souris, dilués entre 1:100 et 1:500 ont été utilisés après avoir préalablement été testés sur des extraits tissulaires de rat par immunobuvardage contre les protéines CB1 et CB2. Des IgG de chèvre et de lapin non spécifiques ont été utilisés comme marqueur pour le contrôle négatif. Après la période d'incubation, les anticorps ont été lavés avec une solution tampon de PBS, et les coupes histologiques ont été incubées avec un anticorps biotinylé de cheval développé contre les IgG de chèvre ou un anticorps de chèvre développé contre les IgG de lapin (1:400) (Vector Labs Inc., Burlingame, CA). Le

marquage a été complété en incubant les coupes histologiques avec une solution contenant un complexe d'avidine et de peroxydase (ABC kit; Vector Labs Inc.), et une exposition de 5 minutes à une solution de 3,3'-diaminobenzidine (DAB kit; Vector Labs Inc.) a permis la visualisation des anticorps correspondant au marquage des protéines d'intérêt. Les cœurs ont ensuite été contremarqués avec une solution #3 d'hématoxyline de Gill, rincés avec de l'eau distillée et installés sur une lame de façon permanente avec une solution appropriée.

3.i) Extraction d'ARN et RT-PCR

L'ARN total a été extrait à partir de tissus ventriculaire avec le réactif Trizol selon les recommandations du manufacturier (Life Technology). Des copies ADN (cDNA) de l'ARN total ont été obtenues avec la transcriptase inverse du virus aviaire du myéloblastose (*Avian Myeloblastosis Virus, AMV reverse transcriptase*, Amersham) et des hexamères aléatoires. Un microgramme d'ARN a été prélevé et le volume de l'échantillon a été complété à 5 µl avec de l'eau traitée au DEPC. L'échantillon a été dénaturé à 65°C pour 10 minutes puis ramené à 4°C. L'AMV (2U) a ensuite été ajouté à l'échantillon, de même que le tampon fourni (5X), les amorces d'hexamères aléatoires (5µM), les nucléotides (0,2 mM), l'inhibiteur des RNase (20 U) et l'eau DEPC pour compléter le volume final à 20 µl. La réaction s'est déroulée à 42°C pour 60 minutes, le contenu des échantillons a ensuite été chauffé à 94°C pour 5 minutes puis ramené à 4°C. L'ADN complémentaire a été divisé en trois fractions égales de 6 µl qui ont été soumises à la réaction de PCR avec 2,5 U de l'enzyme polymérase Taq (Amersham Bioscience), le tampon fourni (10X), les amorces 3' et 5' nécessaires (25 pM), les nucléotides (0,2 mM) et de l'eau DEPC pour compléter le volume final à 86 µl. La spécificité des amorces utilisées a été confirmée par une analyse de type *geneblast* sur la banque de données *genebank* (CB1 sens: 5'-CGT AAA GAC AGC CCC AAT- 3'; antisens: 5'-CTG GGT CCC ACG CTG AAT- 3') (CB2 sens: 5'-TTT-CAC-GGT-GTG-GAC-TCC- 3'; antisens: 5'-TAG-GTA-GGA-GAT-CAA-CGC- 3'). La séquence de l'ADN complémentaire pour les récepteurs CB1 et CB2 du *rattus norvegicus*

est fournie en annexe de la thèse. Les amorces utilisées pour le contrôle GAPDH ont été pour leur part respectivement : sens 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' et antisens 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'. Les réactions de PCR se sont déroulées selon le protocole suivant : 5 min à 94°C, puis 35 cycles (30 cycles pour GAPDH) défini par 1 min à 94°C, 1 min à la température de fusion propre à l'amorce (47°C pour CB1, 55° pour CB2 et 59° pour GAPDH) et 1 min à 72 °C puis la réaction a été terminée par une période de 7 minutes à 72°C et les produits ont été ramenés à 4°C. Les produits de PCR ont été conservés à -20°C et 20 µl ont été déposés sur un gel d'agarose 1,5 % contenant du bromure d'éthidium, soumis à une électrophorèse de 2 heures et révélés sous une lumière ultraviolette et quantifiés à l'aide de l'appareil Chemilmager (Alpha Innotech). Les produits GAPDH ont servi de contrôles semi quantitatifs internes et à évaluer la contamination possible des échantillons avec de l'ADN génomique qui aurait conséquemment provoqué la présence d'un deuxième produit de PCR dû à un intron présent dans la séquence d'ADN génomique amplifié. Il est à noter que le gène codant pour la protéine CB1 ne contient pas d'intron, ce qui rend nécessaire un contrôle de contamination à l'ADN génomique.

3.j) Statistiques

Les valeurs sont exprimées par la moyenne des résultats \pm l'erreur-type. La comparaison entre les groupes a été effectuée par une analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test post hoc de type Dunnett. La quantification de la réaction enzymatique dans les expériences d'immunobuvardage a permis une analyse numérique des bandes exprimées en calculant un ratio avec une expérience témoin. Un test de *Student* a permis de comparer la densité *versus* celle de l'expérience témoin (établie à 1). Un seuil de significativité (p) inférieur à 0,05 a été retenu pour les fins d'analyse statistique. Nous avons cru intéressant de montrer dans quelques expériences un $p < 0,1$ pour illustrer une tendance.

4. Résultats

4.a) ARN messenger des récepteurs CB1 et CB2 en RT-PCR

Nous avons identifié l'ARN messenger (ARNm) codant pour les deux sous-types de récepteurs dans le cœur de rat (fig 8). Aucune variation de la quantité d'ARN messenger n'a pu être mise en évidence en suivant le protocole étudié. Les données recueillies chez trois groupes d'animaux n'ont montré aucune variation significative de la teneur d'ARN messenger lorsque comparées aux témoins GAPDH. Nous ne pouvons donc pas établir de conclusion autre que de confirmer la présence de ces ARN messagers tout au long du protocole d'ischémie reperfusion, soumis ou non à un traitement avec l'agoniste endogène PEA.

Protéine CB1 et CB2 par immunobuvardage

Les protéines des deux sous-types de récepteurs CB1 et CB2 ont été identifiées dans le cœur de rat. La présence des récepteurs a été confirmée avec un deuxième anticorps. À l'image des résultats obtenus pour l'ARN messenger, aucune variation statistiquement significative de la quantité des deux sous-types de récepteurs n'a pu être appréciée. Le traitement avec l'agoniste PEA n'a pas altéré l'expression des récepteurs cannabinoïdes comme le montre les figures 9 et 10. Trois séries d'animaux pour tous les protocoles étudiés ont permis de faire une analyse statistique.

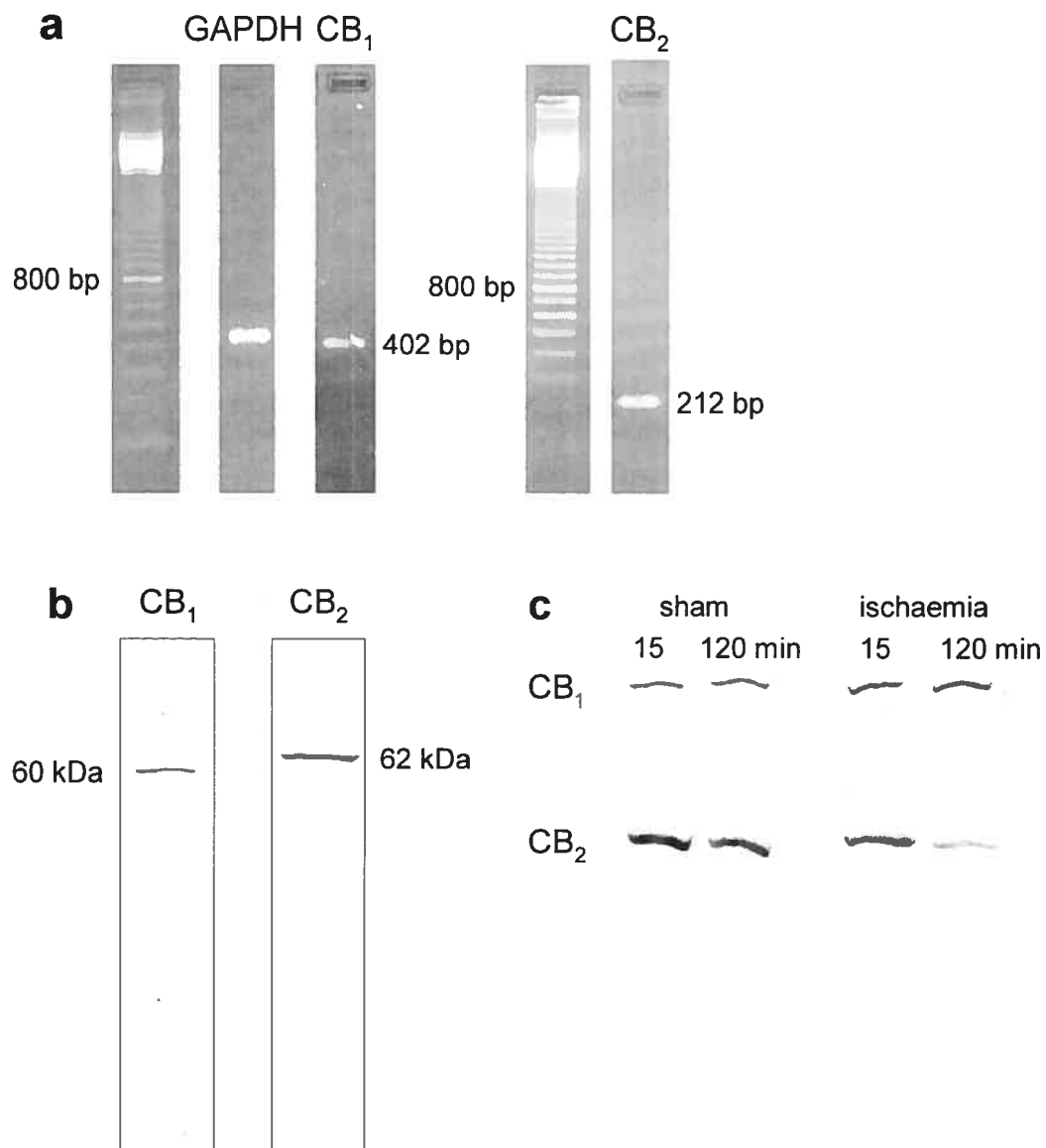


Figure 8. **a** : Résultat des expériences de RT-PCR correspondant à une séquence d'ARNm choisie et amplifiée des gènes codant pour les récepteurs CB1 et CB2. **b** : Immunobuvardage montrant une bande unique reconnue par des anticorps polyclonaux spécifiques pour les protéines CB1 et CB2. **c** : Expression des protéines CB1 et CB2 suite à une perfusion de 15 ou 120 minutes ou une ischémie de 15 ou 120 minutes sans traitement.

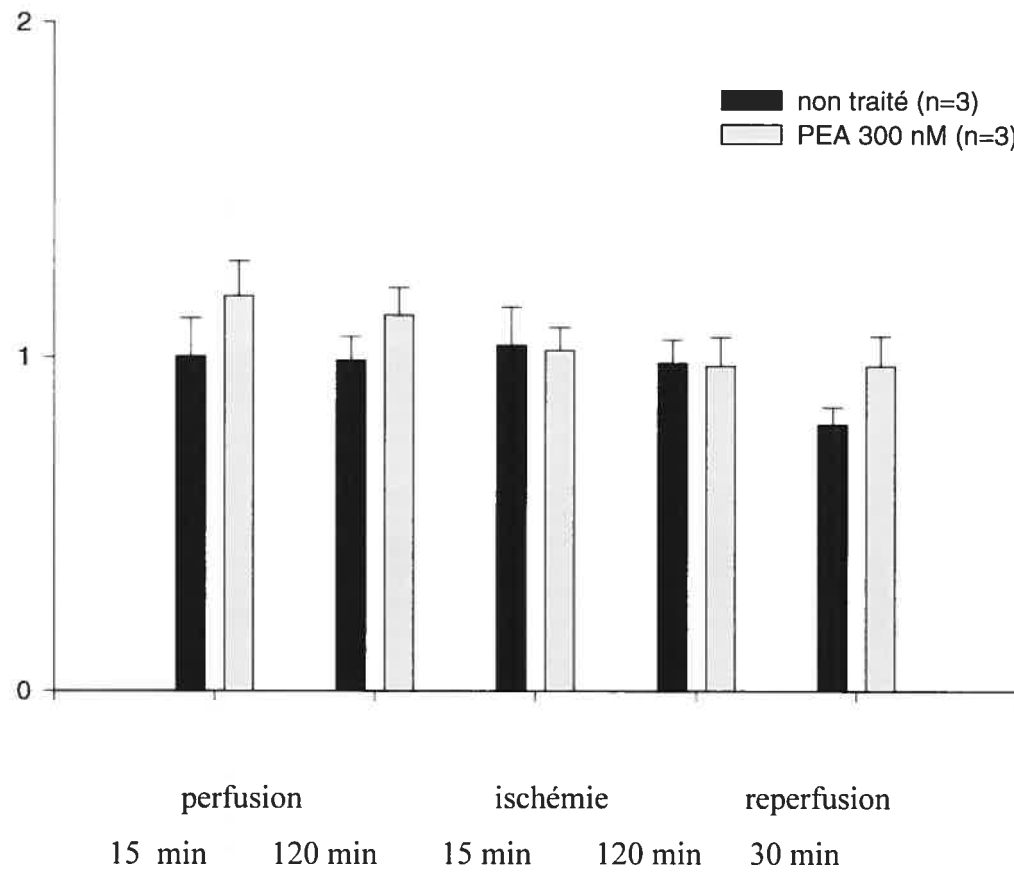


Figure 9. Expression relative de la protéine CB1 évaluée par rapport à un cœur de rat témoin perfusé pour 5 minutes avec une solution de Krebs-Henseleit. Les cœurs ont été soit perfusés pour 15 ou 120 min, soumis à une ischémie de 15 ou 120 min, ou à une reperfusion de 30 min suivant une ischémie de 120 min à 0,5 ml/min, en absence ou en présence de 300 μ M de PEA.

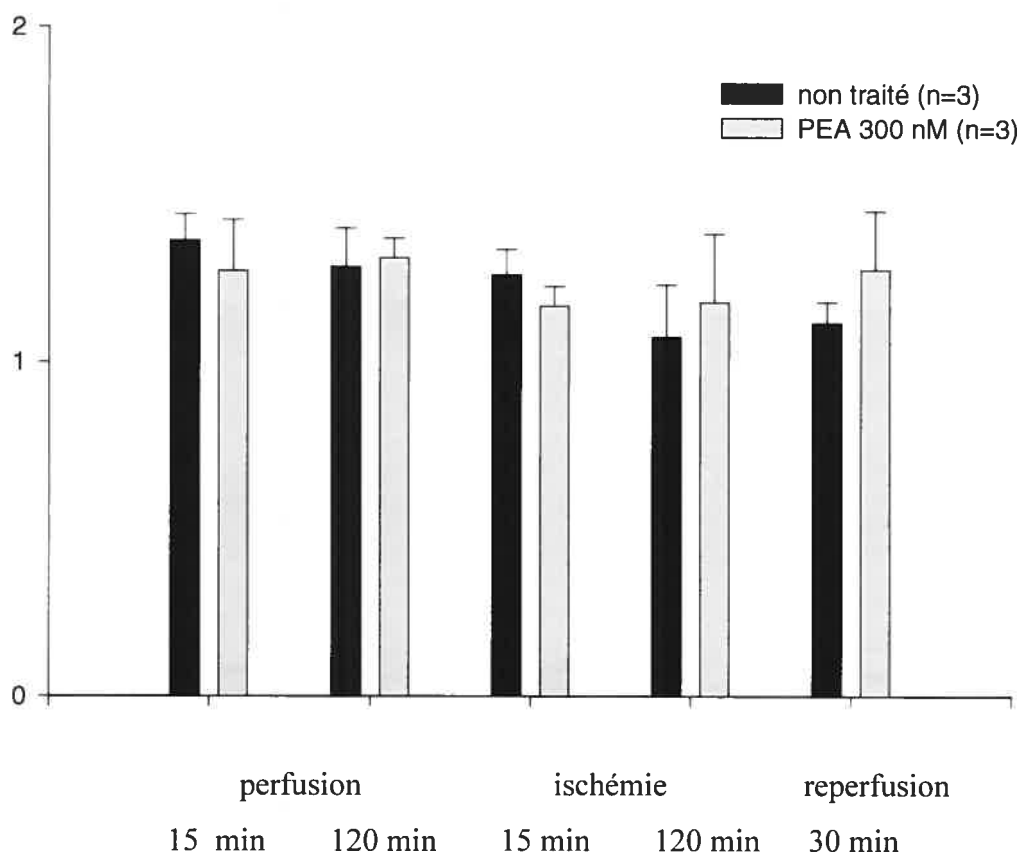
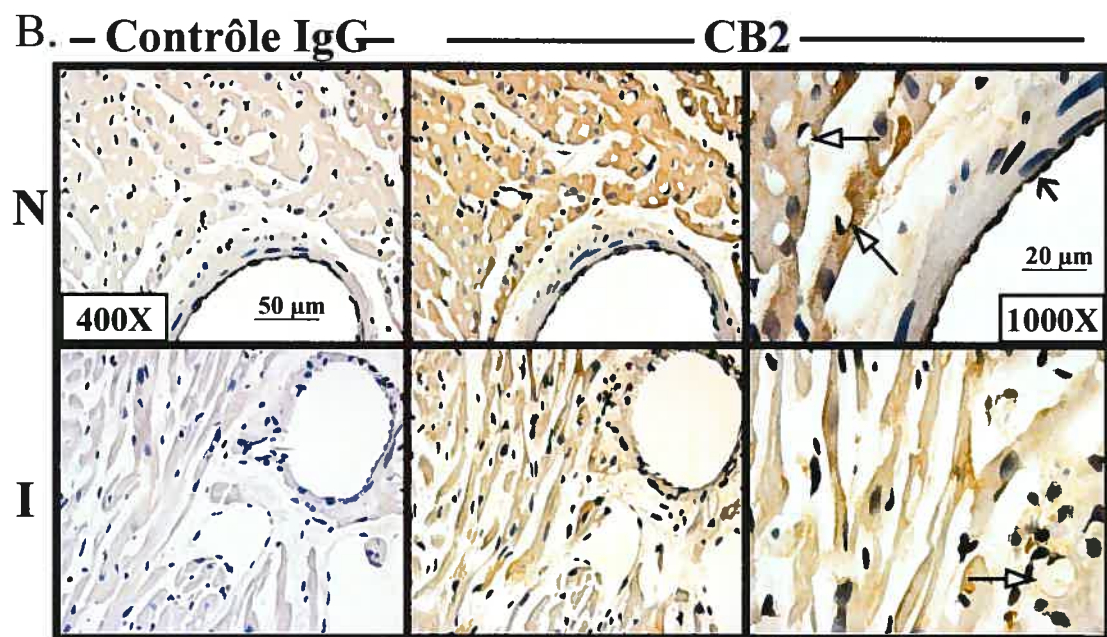
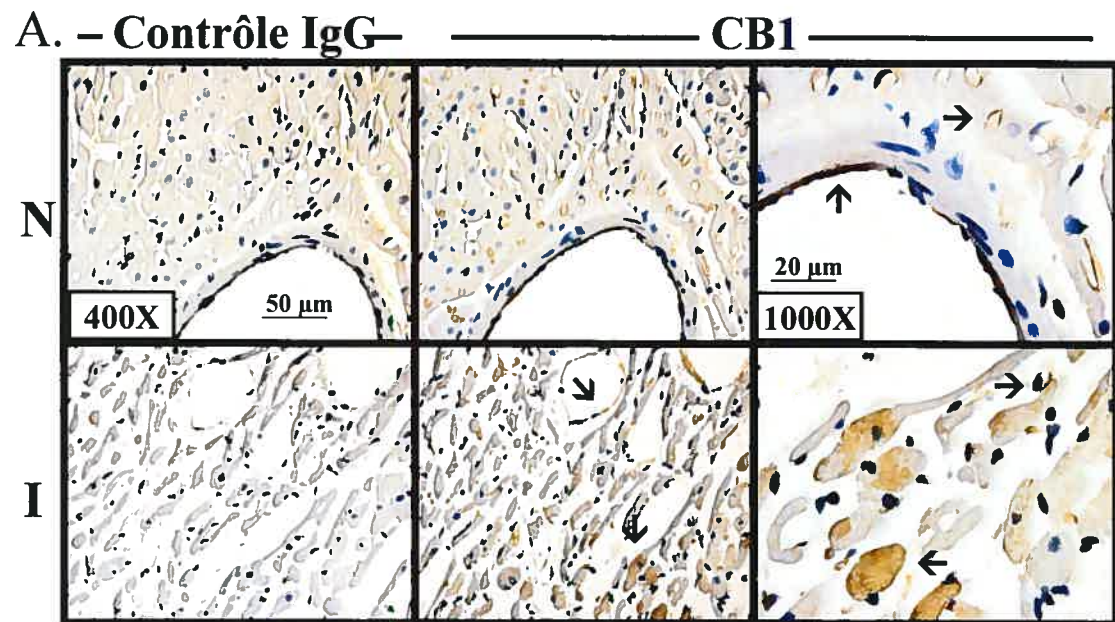


Figure 10. Expression relative de la protéine CB2 évaluée par rapport à un cœur de rat témoin perfusé pour 5 minutes avec une solution de Krebs-Henseleit. Les cœurs ont été soit perfusés pour 15 ou 120 min, soumis à une ischémie de 15 ou 120 min, ou à une reperfusion de 30 min suivant une ischémie de 120 min à 0,5 ml/min, en absence ou en présence de 300 μ M de PEA.

3.b) Immunohistochimie des récepteurs cannabinoïdes dans le cœur

La présence des deux sous-types de récepteurs a aussi été démontrée par des expériences d'immunohistochimie qui ont, de plus, permis d'établir la localisation de ces récepteurs. Le récepteur CB1 a été identifié sur les cellules endothéliales des capillaires ainsi que sur celles des artères de divers calibres dans le cœur sain. Bien que sans effet sur la quantité de protéines observées par immunobuvardage, le phénomène d'ischémie reperfusion a altéré la distribution du récepteur CB1 sur le cœur ischémié. On y retrouve le récepteur CB1 aussi bien sur les cellules endothéliales que sur les cardiomyocytes. La distribution du récepteur CB2 se situe principalement sur les cardiomyocytes tant chez le cœur sain que le cœur ischémié. Il est à noter l'absence de récepteur CB2 sur les capillaires. Nous avons aussi identifié le récepteur CB2 sur les cellules endothéliales des artères de plus gros diamètre, bien que celui-ci ne semble plus observé suite à l'ischémie reperfusion. Nous ne pouvons conclure sur le rôle de l'ischémie sur les changements d'expressions des récepteurs CB1 et CB2 observés par immunohistochimie. Nous avons aussi confirmé le type cellulaire des cardiomyocytes avec une expérience supplémentaire et un anticorps spécifique pour la troponine.



C. Contrôle IgG troponine

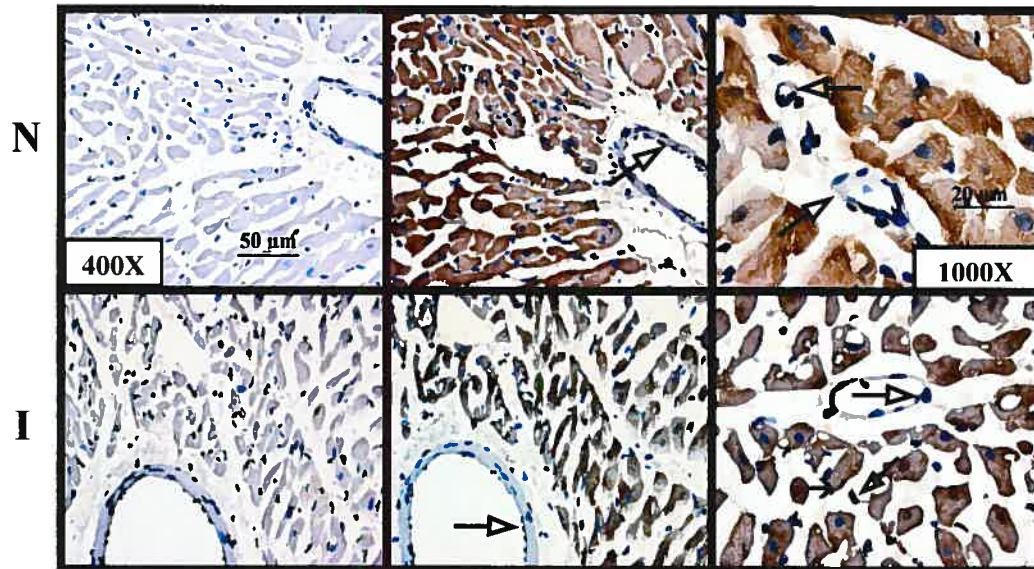


Figure 11. Marquage immunohistochimique de cœur sain normal (N) ou soumis à un épisode de 90 min d'ischémie et de reperfusion (I) pour le récepteur CB1 (panneau A dilution 1:250), CB2 (panneau B dilution 1:100) ou pour la troponine (panneau C dilution 1:50)

4.c) Effets cardioprotecteurs des cannabinoïdes sur la récupération fonctionnelle et effets sur les arythmies. Modèle *ex vivo* et *in vivo*.

Effets protecteurs du PEA sur la récupération de la contractilité ventriculaire et la prévention de l'élévation de la pression diastolique

Nous avons montré les effets protecteurs du cannabinomimétique endogène PEA (300 nM) sur la récupération de la contractilité ventriculaire (dP/dt^+) et la prévention de l'élévation de la pression diastolique ventriculaire gauche (LVDP) chez le rat dans le modèle *ex vivo* d'ischémie globale partielle (21). Cet effet protecteur est dépendant de l'activation du récepteur CB2 puisqu'il est aboli par l'administration préalable d'un agoniste inverse (SR144528, 1 μ M) alors que l'agoniste inverse pour le récepteur CB1 (SR141716A, 1 μ M) est resté sans effet (Figure 12). Les valeurs de dP/dt^+ et de PVDG n'étaient pas statistiquement différentes avant l'épisode ischémique (Tableau 2). Les agonistes inverses SR141716A et SR144528, lorsque administrés seuls, n'ont eu aucun effet statistiquement significatif sur la récupération fonctionnelle à la reperfusion comparativement au groupe non traité (Figure 13).

Tableau 2. Valeurs basales mesurées avant l'ischémie dans une première série d'expériences

<i>Groupes</i>	<i>n</i>	<i>Résistance coronaire</i> (mm Hg•g•min/ml)	<i>Pression diastolique</i> (mm Hg)	<i>dP/dt max</i> (mm Hg/s)
non traité	6	12,1 ± 0,7	10,8 ± 2,3	1787 ± 57
PEA	5	15,5 ± 1,6	12,0 ± 2,0	1550 ± 77
PEA + SR141716A	5	12,5 ± 1,2	11,9 ± 2,1	1505 ± 53
PEA + SR144528	5	9,2 ± 1,0	8,0 ± 3,0	1540 ± 87
SR141716A	6	13,0 ± 1,1	11,3 ± 0,9	1775 ± 189
SR144528	6	13,0 ± 1,9	10,5 ± 1,8	1458 ± 61

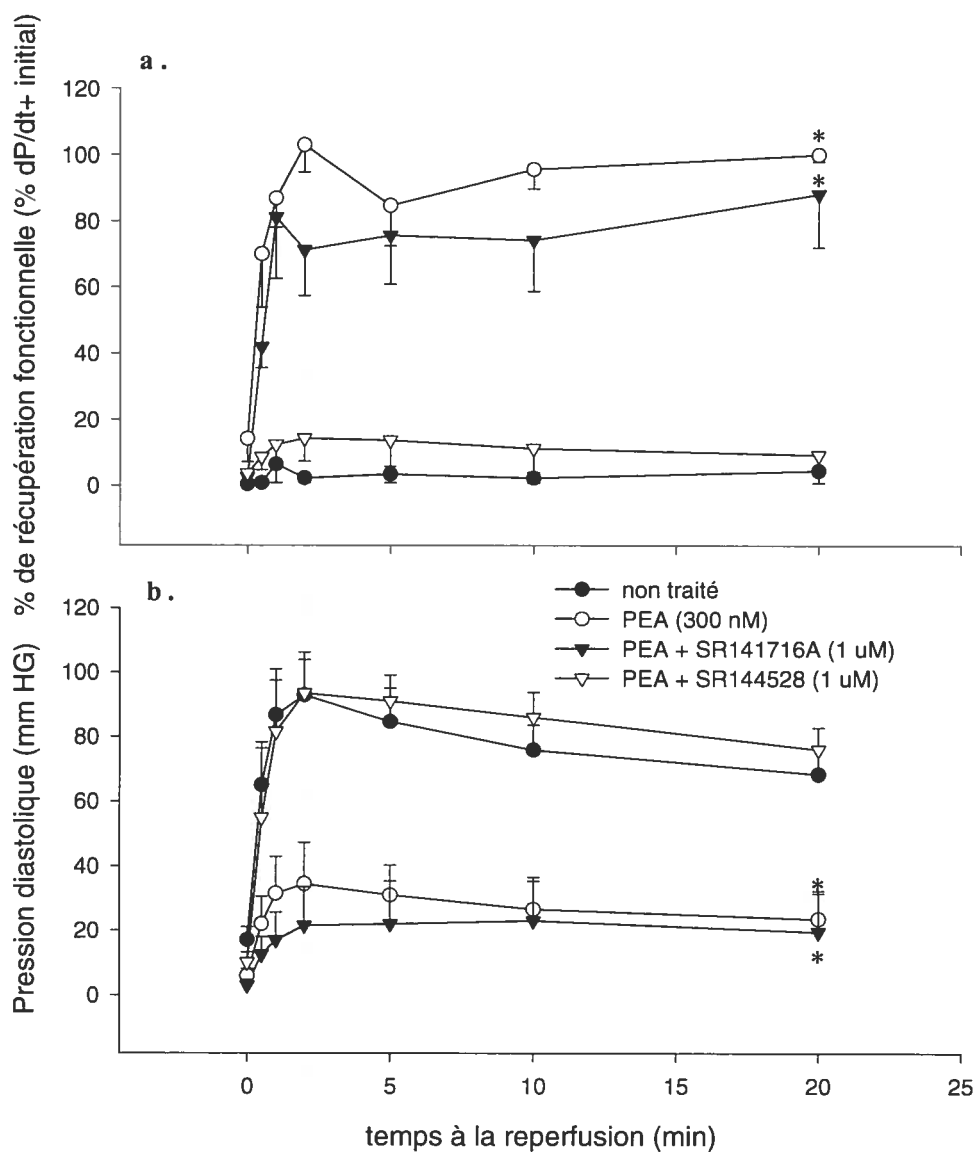


Figure 12. **a** : Récupération de la contractilité ventriculaire (dP/dt^+) suite à un traitement avec le PEA (300 nM) seul ou avec un agoniste inverse pour les récepteurs CB1 (SR141716A, 1 μ M) ou CB2 (SR144528, 1 μ M). **b** : Effet du PEA et des agonistes inverses sur l'élévation de la pression diastolique ventriculaire gauche (LVDP) à la reperfusion. Les cœurs ont été soumis à une ischémie de 90 min à 0,6 ml/min et 20 min de reperfusion.

* $p < 0,05$ vs non traité

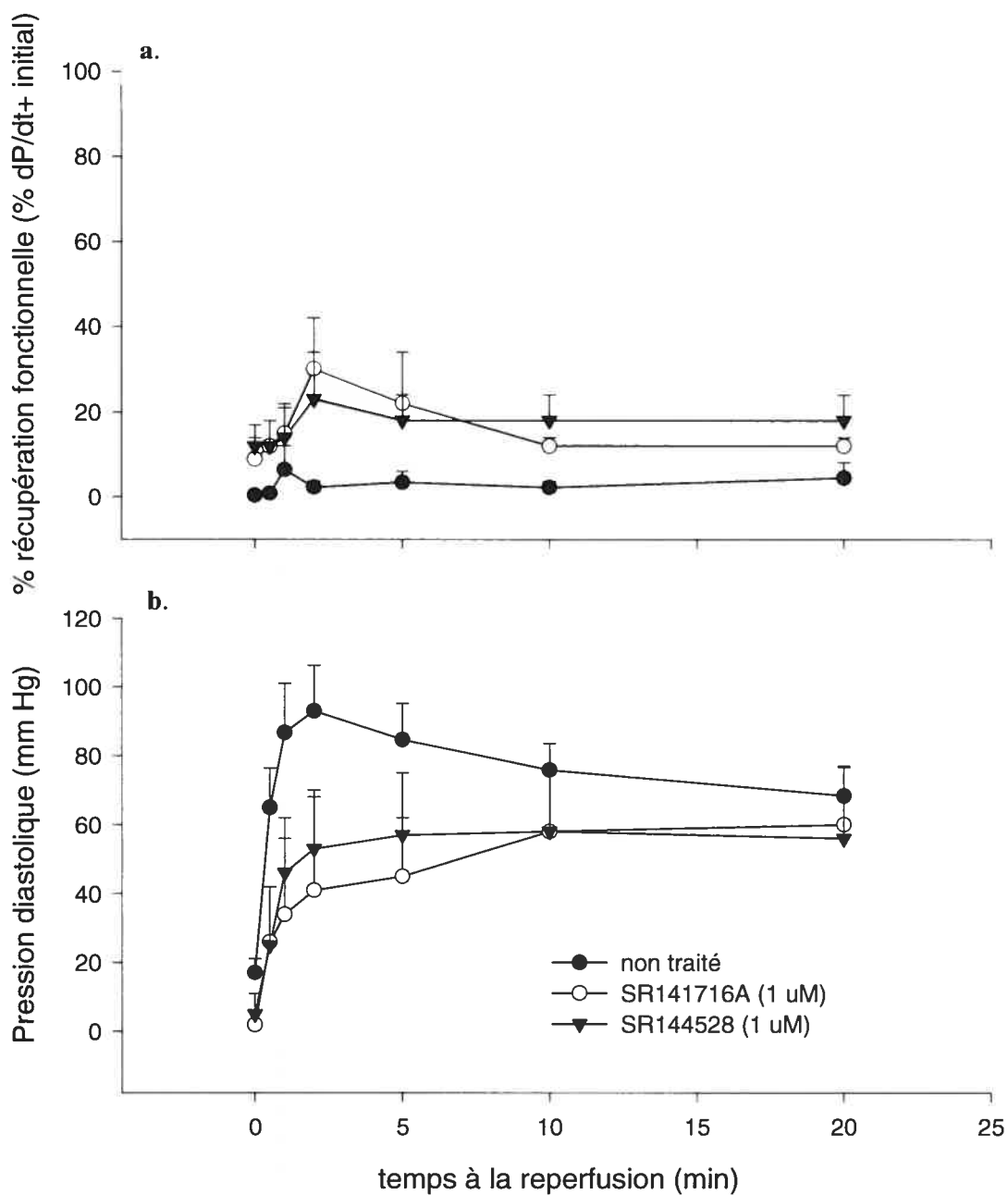


Figure 13. **a** : Récupération de la contractilité ventriculaire (dP/dt^+) suite à un traitement avec les agonistes inverses pour le récepteur CB1 (SR141716A, 1 μ M) ou CB2 (SR144528, 1 μ M) seulement. **b** : Élévation de la pression diastolique (LVDP) à la reperfusion. Les cœurs ont été soumis à une ischémie de 90 min à 0,6 ml/min et 20 min de reperfusion. $p = \text{NS}$ vs non traité

Effets protecteurs d'agonistes sélectifs pour le récepteur CB1 (ACEA, 50 nM) ou CB2 (JWH133, 10 nM)

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons confirmé la prédominance du rôle du récepteur CB2 dans la cardioprotection observée en mesurant l'effet de deux agonistes sélectifs (ACEA, 50 nM ou JWH133, 10 nM) sur la récupération fonctionnelle. Le tableau 3 indique les valeurs des paramètres physiologiques avant les perfusions indiquées (T_{-15}), avant le début de l'ischémie (T_0), avant la reperfusion (T_{90}) et à la fin de l'expérience (T_{120}). Le groupe traité avec l'agoniste CB2 a montré une récupération de la contractilité ventriculaire rapide et soutenue ($40 \pm 10\%$ après 20 min, $p < 0,05$ vs non traité $10 \pm 4\%$) contrairement au groupe traité avec l'agoniste CB1 ($25 \pm 12\%$ après 20 min, $p = \text{NS}$ vs non traité) qui n'a montré qu'une récupération rapide et transitoire dans les deux premières minutes de la reperfusion (Figure 14). De plus, les tests statistiques montrent une tendance à savoir que l'effet protecteur du JWH133 a été bloqué par l'agoniste inverse SR144528 ($26 \pm 9\%$ $p = \text{NS}$) mais pas par le SR141716A ($38 \pm 14\%$ $p = \text{NS}$).

Les mêmes conclusions s'imposent suite à l'analyse des résultats sur l'élévation de la pression diastolique. Seul le traitement avec l'agoniste CB2 (JWH133, 10 nM) a prévenu de façon statistiquement significative l'élévation de la pression diastolique de façon soutenue (élévation de 33 ± 7 mm Hg, $p < 0,05$ vs non traité, avec une élévation de 61 ± 6 mm Hg après 20 minutes) (Figure 15). L'effet du pré-traitement avec l'un ou l'autre des

deux agonistes inverses sur ce traitement a annulé l'effet cardioprotecteur (JWH133 + SR141716A, élévation de 48 ± 11 mm Hg et JWH133 + SR144528, élévation de 54 ± 10 mm Hg, $p = \text{NS}$ vs non traité). Bien que le traitement avec l'agoniste CB1 (ACEA, 50 nM) n'ait pas produit une diminution significative de la pression diastolique (élévation de 42 ± 7 mm Hg, $p = \text{NS}$) et que le pré-traitement avec l'agoniste inverse CB1 soit aussi resté sans effet (ACEA + SR141716A, élévation de 46 ± 7 mm Hg), la combinaison agoniste CB1 avec l'agoniste inverse CB2 a provoqué une baisse significative de la pression diastolique (ACEA + SR144528, élévation de 31 ± 7 mm Hg, $p < 0,05$ vs non traité). Nous décrivons ultérieurement un résultat similaire décrivant la récupération de la contractilité ventriculaire suite à l'administration de N-nitro-L-arginine précédant celle d'ACEA.

Tableau 3. Paramètres physiologiques d'une deuxième série d'expériences

Paramètre	Groupes	n	T ₋₁₅	±	T ₀	±	T ₉₀	±	T ₁₂₀	±
Débit de perfusion coronaire (ml/min)	non traité	12	14	0,4	14	0,4	0,4	0	14	0,4
	SR141716A	3	14,2	0,8	14,2	0,8	0,4	0	14,2	0,8
	SR144528	4	14,4	0,6	14,4	0,6	0,4	0	14,4	0,6
	ACEA	10	12,2	0,6	12,2	0,6	0,4	0	12,2	0,6
	ACEA + SR141716A	8	13,4	0,7	13,4	0,7	0,4	0	13,4	0,7
	ACEA + SR144528	7	13,1	0,5	13,1	0,5	0,4	0	13,1	0,5
	JWH133	15	13,9	0,4	13,9	0,4	0,4	0	13,9	0,4
	JWH133 + SR141716A	9	13,4	0,5	13,4	0,5	0,4	0	13,4	0,5
	JWH133 + SR144528	8	12,4	0,5	12,4	0,5	0,4	0	12,4	0,5
Pression de perfusion coronaire (mm Hg)	non traité	12	84,2	4,2	91	3,2	11,8	3,9	139,1	10,8
	SR141716A	3	67,3	4,3	80	11,5	15	5	110,7	32,2
	SR144528	4	58	4,3	43*	9,4	11,3	4,7	91,3	6,3
	ACEA	10	98,2	7,3	100,7	7,3	17,4	5	111,6	9
	ACEA + SR141716A	8	91,8	4,2	107,1	10	12,5	3,5	133,6	13
	ACEA + SR144528	7	85,7	4	75	4,4	10,8	4,5	92,7	4,6
	JWH133	15	74,4	5,7	87	7,9	8,9	1,8	113,9	10,6
	JWH133 + SR141716A	9	73,6	4,9	74,9	7,1	8,9	3,2	122,2	12,6
	JWH133 + SR144528	8	80,3	4,4	96,1	9,6	11,3	4,2	128,1	11
Pression diastolique ventriculaire gauche (mm Hg)	non traité	12	9,3	3	9,9	3,1	5,9	2,3	66,8	5,7
	SR141716A	3	15,7	3,5	13,3	1,7	24	2,1	85,7	5,8
	SR144528	4	15,5	0,5	13	1,2	23	10,1	73	15
	ACEA	10	11,7	2,7	11	2,6	14,7	4	56,6	9,9
	ACEA + SR141716A	8	13	2,9	15,8	4,1	18,6	2,6	64,8	8,1
	ACEA + SR144528	7	16,7	2,4	17,4	2,4	19,1	3,5	50,3	9,8
	JWH133	15	10,3	2,4	8,6	2,6	12,2	3,7	43,7	7,8
	JWH133 + SR141716A	9	9,4	3,2	9,1	3,1	13,6	4,4	58	13,8
	JWH133 + SR144528	8	8,4	3,1	11,5	3,7	9,6	3,8	69,3	10,4
Pression ventriculaire gauche développée (mm Hg)	non traité	12	67,3	3,7	58,1	6,2	0	0	7,5	2,8
	SR141716A	3	78,3	11,7	95	15,3	0	0	2,3	2,3
	SR144528	4	75	12,2	90	15,4	3,8	3,8	15	7,4
	ACEA	10	67	5,9	69	6,5	1	1	16,5	8,6
	ACEA + SR141716A	8	77,5	5,3	61,3	7,4	3,8	1,8	18,1	6,9
	ACEA + SR144528	7	69,3	6,7	78,6	9,3	1	1	32,1	14,3
	JWH133	15	78,5	6,1	81,5	7	2	1,4	38,3*	10,1
	JWH133 + SR141716A	9	97,8*	6,6	99,1*	7,3	0	0	36,7	10,4
	JWH133 + SR144528	8	83	8,8	88,8*	10,1	0	0	13,4	5,6
Maximum dP/dt (mm Hg/sec)	non traité	12	1783	111	1908	146	13	13	196	69
	SR141716A	3	1733	268	2117	309	0	0	50	50
	SR144528	4	1813	279	2263	386	100	100	300	137
	ACEA	10	1730	133	1880	152	40	40	470	226
	ACEA + SR141716A	8	1788	116	1575	180	75	40	397	157
	ACEA + SR144528	7	1629	142	1954	196	0	0	829	396
	JWH133	15	2087	134	2267	178	40	31	990*	278
	JWH133 + SR141716A	9	2539*	253	2906*	324	0	0	950	228
	JWH133 + SR144528	8	2353	264	2525	228	0	0	469	196

Anova des valeurs brutes pour chaque temps suivi d'un test de Dunnett vs non traité

* p<0,05

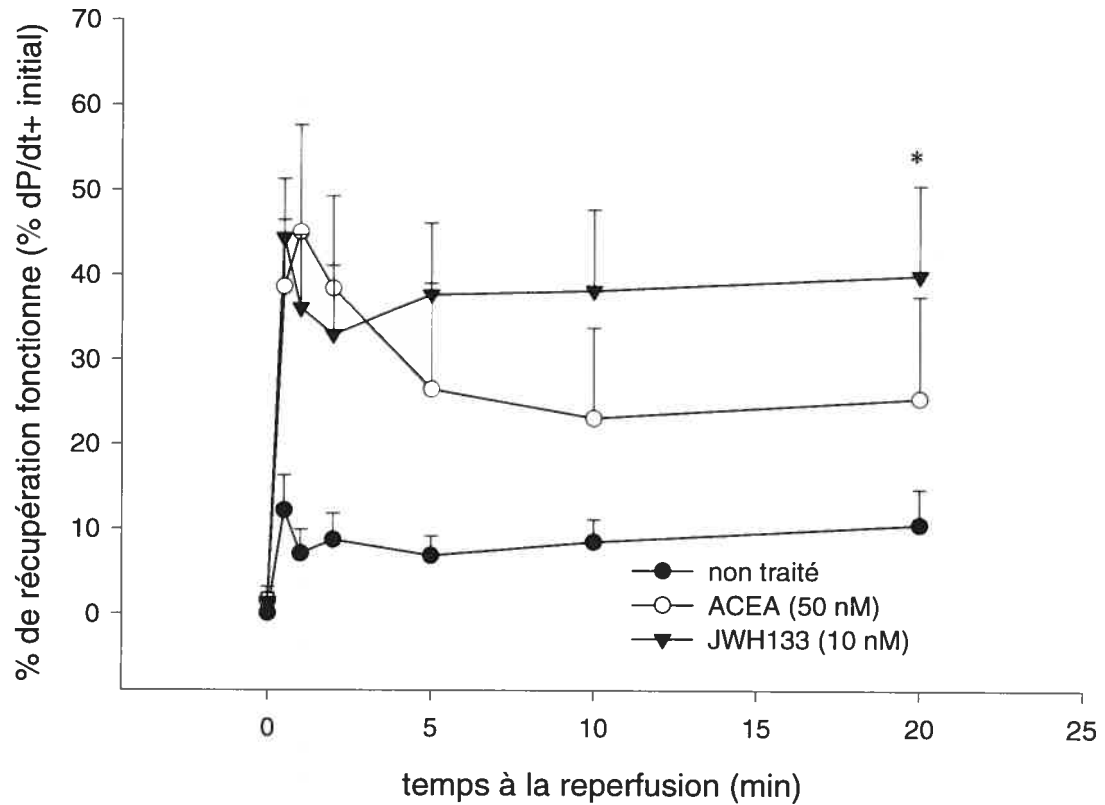


Figure 14. Récupération de la contractilité ventriculaire (dP/dt^+) à la reperfusion pour des agonistes sélectifs des récepteurs CB1 (ACEA, 50 nM) ou CB2 (JWH133, 10 nM) perfusés pendant l'ischémie de 90 min à 0,4 ml/min.

* $p < 0,05$ vs non traité

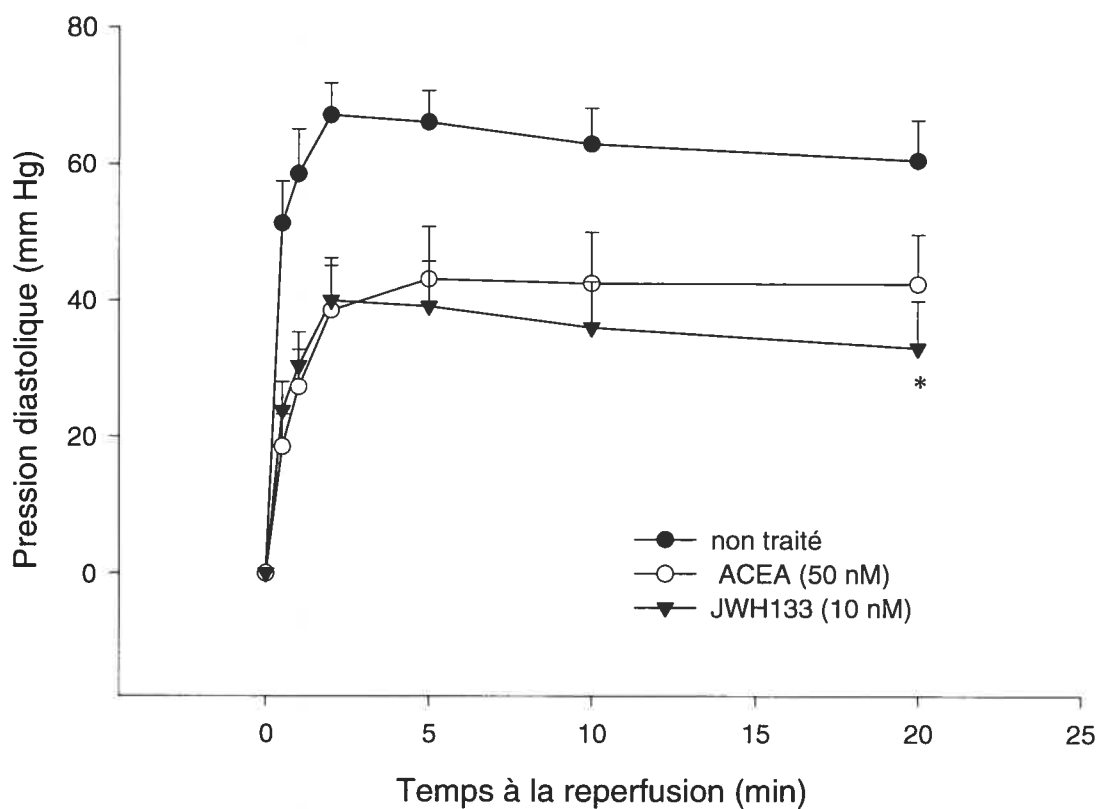


Figure 15. Élévation de la pression diastolique à la reperfusion pour des agonistes sélectifs des récepteurs CB1 (ACEA, 50 nM) ou CB2 (JWH133, 10 nM) perfusés pendant l'ischémie de 90 min à 0,4 ml/min.

* $p < 0,05$ vs non traité

Nous nous sommes attardés davantage sur l'agoniste CB2 (JWH133) qui semblait plus prometteur et avons évalué l'effet du moment d'administration de cet agoniste sur la protection conférée par celui-ci. L'agoniste était perfusé à une concentration de 10 nM pendant 15 minutes avant l'ischémie, pendant les 90 minutes d'une ischémie à 0,4 ml/min ou pendant les 60 minutes de reperfusion suivant une ischémie telle que décrit. Un dernier groupe a reçu l'agoniste inverse SR144528 (1 μ M) 15 minutes avant l'ischémie, de même que durant toute la durée de celle-ci et l'agoniste CB2 pendant toute la durée de l'ischémie. Les résultats à 60 minutes de reperfusion montrent que l'administration avant et pendant l'ischémie a eu un effet protecteur tant pour la récupération de la contractilité ventriculaire (respectivement $61 \pm 10\%$ et $56 \pm 14\%$, $p < 0,05$ vs non traité à $14 \pm 5\%$)(Figure 16) que pour l'élévation de la pression diastolique (respectivement une élévation de 16 ± 6 mm Hg et 16 ± 6 mm Hg, $p < 0,05$ vs non traité, avec une élévation de 43 ± 9 mm Hg)(Figure 17), alors que l'administration post ischémie ou le prétraitement avec l'agoniste inverse n'ont pas reproduit ces résultats (respectivement une récupération du dp/dt^+ initial de $44 \pm 14\%$ et $22 \pm 15\%$, $p = \text{NS}$ vs non traité et une élévation de la pression diastolique de 36 ± 7 mm Hg et 72 ± 15 mm Hg, $p = \text{NS}$ vs non traité).

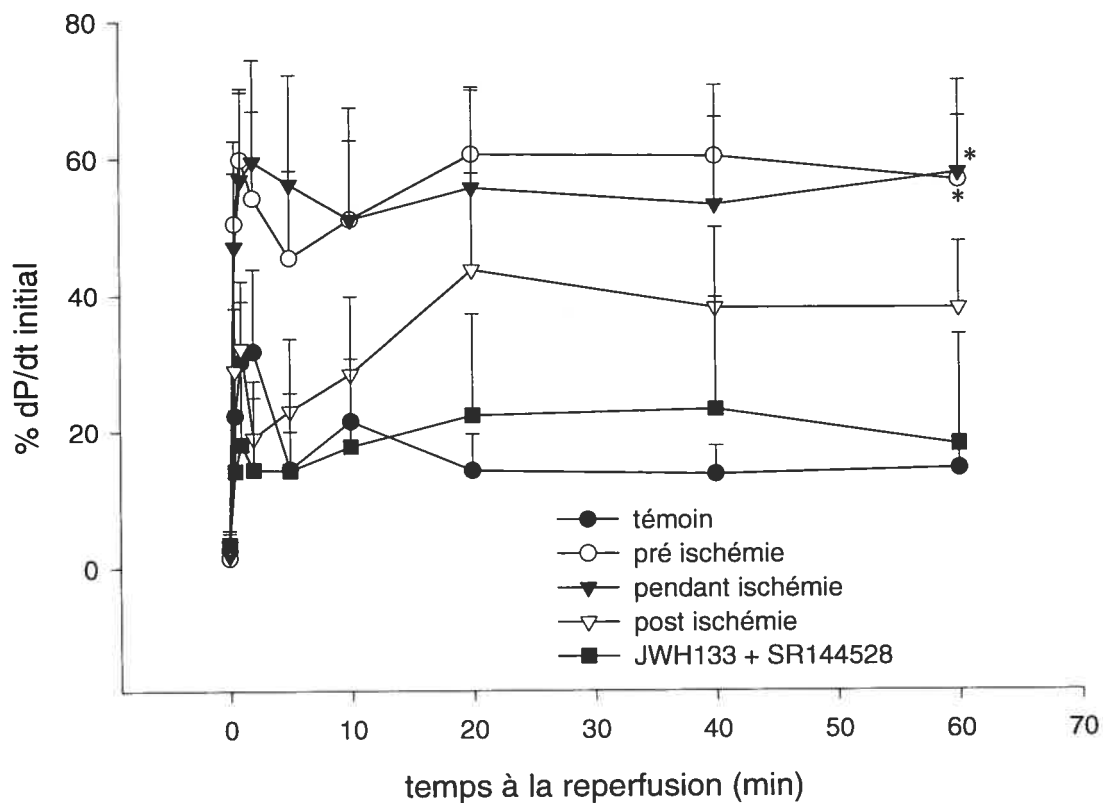


Figure 16. Récupération de la contractilité ventriculaire (dP/dt^+) à la reperfusion pour l'agoniste sélectif au récepteur CB2 (JWH133, 10 nM) en fonction du moment d'administration. L'agoniste CB2 a été perfusé soit 15 min avant l'ischémie (pré ischemie), pendant les 90 min d'ischémie (pendant ischemie) ou pendant les 60 min de reperfusion suivant une ischémie de 90 min à 0,4 ml/min (post ischemie). * $p < 0,05$ vs non traité

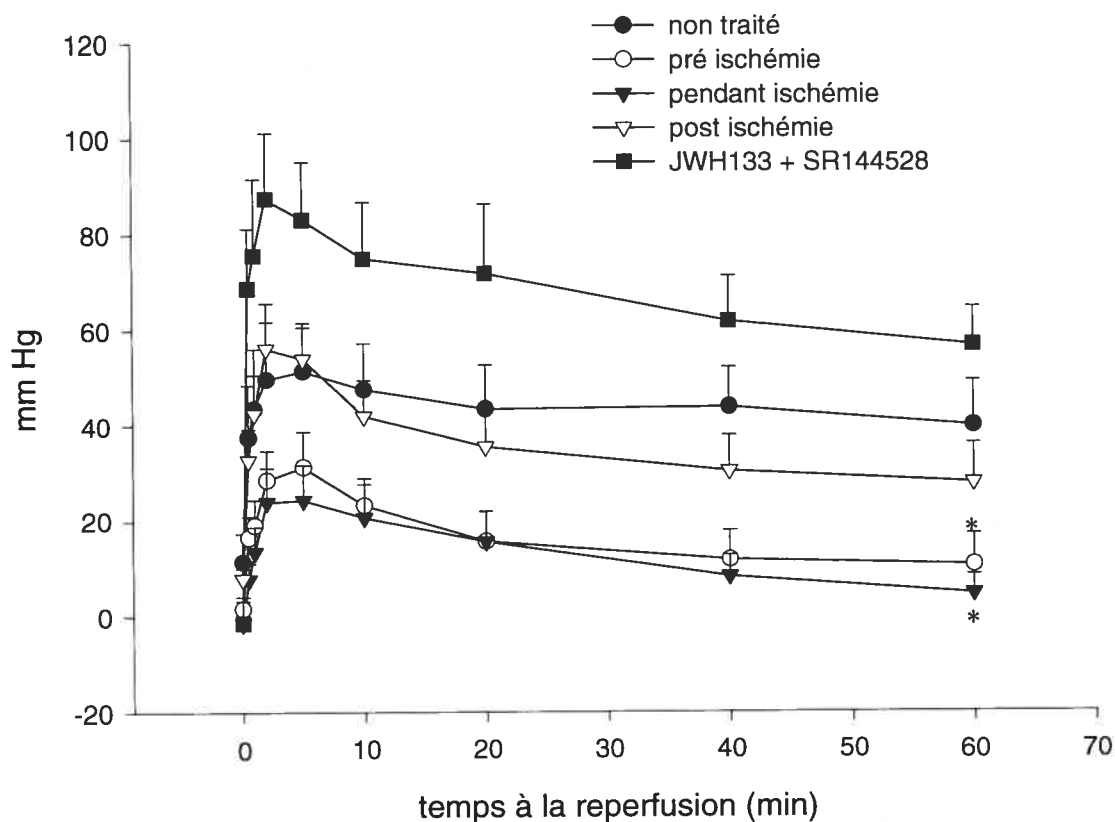


Figure 17. Élévation de la pression diastolique à la reperfusion pour l'agoniste sélectif au récepteur CB2 (JWH133, 10 nM) en fonction du moment d'administration. L'agoniste CB2 a été perfusé soit 15 min avant l'ischémie (pré ischemie), pendant les 90 min d'ischémie (pendant ischemie) ou pendant les 60 min de reperfusion suivant une ischémie de 90 min à 0,4 ml/min (post ischemie). * $p < 0,05$ vs non traité

Effet du CP55940 sur les paramètres physiologiques et les arythmies dans un modèle *in vivo* d'ischémie régionale complète transitoire.

Nous avons pu procéder à une évaluation plus globale des effets cardiovasculaires des cannabinoïdes grâce au modèle *in vivo* décrit précédemment. Nous avons ainsi confirmé les effets connus des cannabinoïdes sur la pression artérielle moyenne (PA). Une perfusion intra veineuse rapide de la solution de CP55940 a montré une baisse de pression artérielle moyenne de 54 mm Hg ou 42% de la pression artérielle moyenne avant traitement ($p < 0,05$). Aucun des agonistes inverses utilisés n'a pu renverser cette baisse de pression bien que l'AM251 (baisse de PA de 31 mm Hg ou 26%, $p < 0,05$) semble avoir eu un léger effet inhibiteur comparativement au SR144528 (baisse de PA de 49 mm Hg ou 41%, $p < 0,05$). Cet effet hypotenseur n'est pas dû à l'effet du véhicule puisque la perfusion intra veineuse rapide du véhicule seul est restée sans effet sur la tension artérielle (baisse de PA de 5 mm Hg ou 4%, $p = \text{NS}$). L'injection intra péritonéale des antagonistes seuls a, pour sa part, provoqué une baisse rapide et transitoire de la pression artérielle, qui est due, quant à elle, à l'effet du véhicule puisque celui-ci a provoqué la même chute rapide et transitoire de pression artérielle (baisse de PA de 9 mm Hg ou 8%, $p < 0,05$). Nous discuterons ultérieurement de cet effet du véhicule sur la pression artérielle.

Nous avons aussi effectué une mesure de la fréquence cardiaque pour calculer le produit $[\text{PA} \times \text{FC}]$ qui nous permet d'évaluer le travail pendant l'ischémie pour comparer les

groupes. Le groupe traité avec le CP55940 montre une tendance à la baisse de son produit $[PA \times FC]$ pendant l'ischémie, principalement due à la chute de pression artérielle causée par le cannabinoïde, qui n'est cependant pas statistiquement significative comparativement au groupe non traité (Tableau 4). Le prétraitement avec chacun des deux agonistes inverses n'a pas causé de changement dans le produit durant l'ischémie. Les agonistes inverses utilisés seuls n'ont pas un produit statistiquement différent du groupe non traité, mais le groupe d'animaux traité avec l'agoniste inverse CB1 (AM251) montre un produit supérieur au groupe traité avec le CP55940.

Tableau 4 Données de pression artérielle moyenne (PA) et du produit de la pression artérielle par la fréquence cardiaque (PA×FC) pendant l'ischémie et la reperfusion pour les différents groupes étudiés.

Groupe	n	PA	PA×FC	PA	PA×FC
		(mm Hg)	(10 ³ mm Hg/sec)	(mm Hg)	(10 ³ mm Hg/sec)
		ischémie		reperfusion	
non traité	6	100 ± 13	38 ± 8	94 ± 9	38 ± 4
véhicule agoniste	7	103 ± 5*	37 ± 4*	105 ± 4*	37 ± 3
véhicule antagoniste	4	94 ± 3	33 ± 2	98 ± 3	34 ± 3
CP55940	9	69 ± 5	22 ± 2	77 ± 7	26 ± 3
CP55940 + AM251	5	84 ± 10	27 ± 4	94 ± 12	31 ± 7
AM251	5	99 ± 5	33 ± 2	117 ± 4 *	44 ± 3*
CP55940 + SR144528	4	70 ± 8	21 ± 4	78 ± 13	25 ± 6
SR144528	2	111 ± 11	41 ± 3	115 ± 6	42 ± 0,1

* p < 0,05 vs CP55940

Nous avons procédé à l'analyse de l'électrocardiogramme afin de déterminer la présence, évaluer la durée et qualifier la nature des arythmies observées dans les différents groupes étudiés. La présence d'extrasystoles, l'absence d'une systole, l'apparition d'un foyer ectopique régissant le rythme, des épisodes de tachycardie ventriculaire, de même que des épisodes de fibrillation ventriculaire réversibles ou non décrivent la majorité des anomalies de rythmes rencontrées chez les animaux. Nous montrons dans les graphiques de la figure 18, les courbes de survie des animaux sur une base arythmogénique pour les différents groupes étudiés. Seule la mortalité due à des arythmies est prise en compte. Le groupe traité avec le CP55940, semble présenter une incidence inférieure de fibrillations ventriculaires, d'une durée d'arythmies globalement plus courte et donc, d'un meilleur taux de survie. Bien qu'aucune conclusion ressorte d'une analyse statistique, une tendance vers une hausse de la mortalité se dessine pour l'agoniste inverse CB2 (SR144528), plus particulièrement lorsqu'il est utilisé seul. Lorsque nous avons procédé au classement qualitatif des animaux pour chacune des quatre classes arythmogéniques décrites précédemment, nous n'avons pu conclure de façon satisfaisante sur l'effet des différents principes pharmacologiques à l'étude (Figure 19).

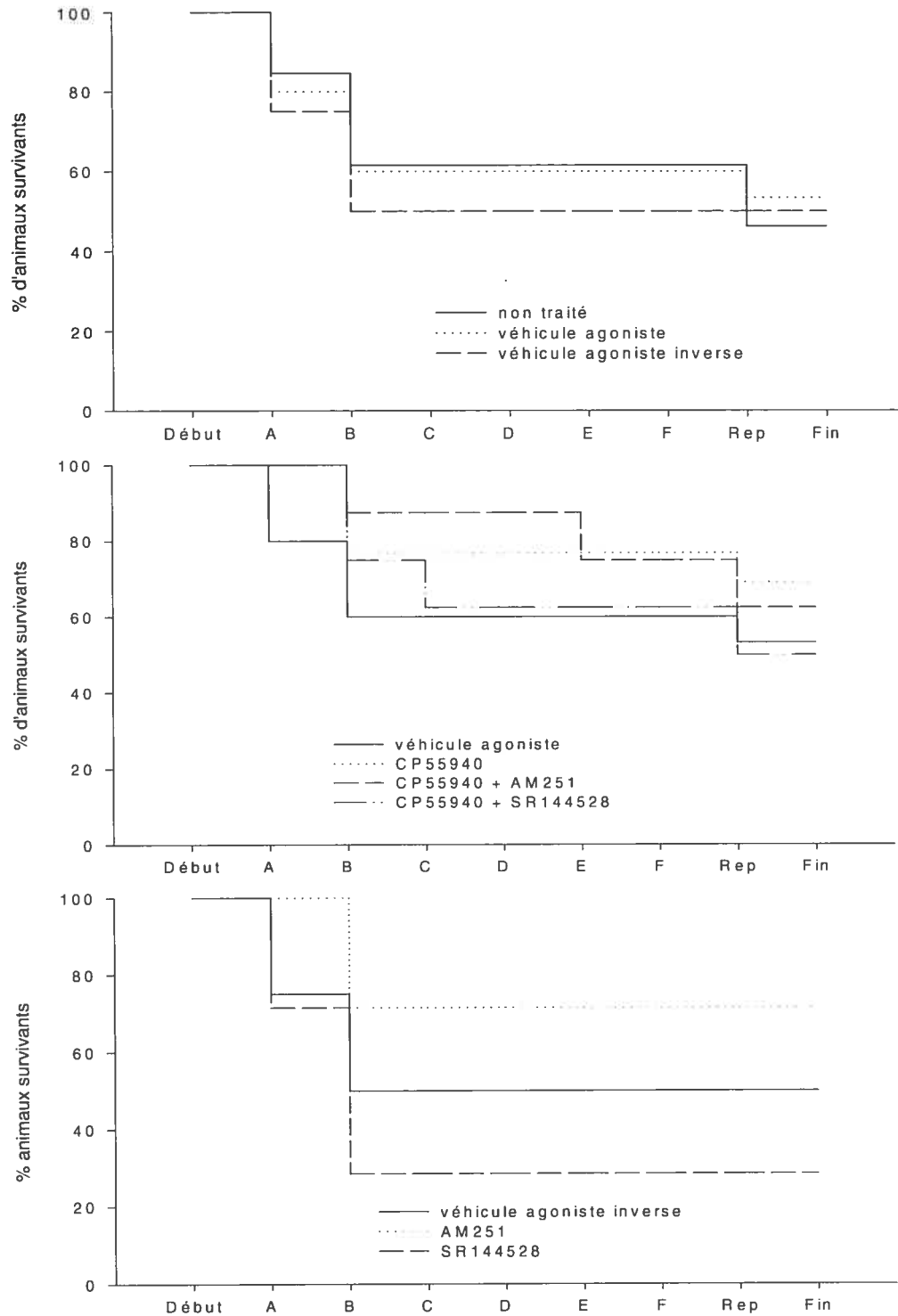


Figure 18. Courbe de survie des animaux pour les groupes non traités, traités avec un véhicule, l'agoniste non sélectif CP55940, les agonistes inverses AM 251 et SR144528 ou une combinaison d'entre eux. L'ischémie de 30 min a été divisée en six intervalles de 5 min nommés A, B, C, D, E et F.

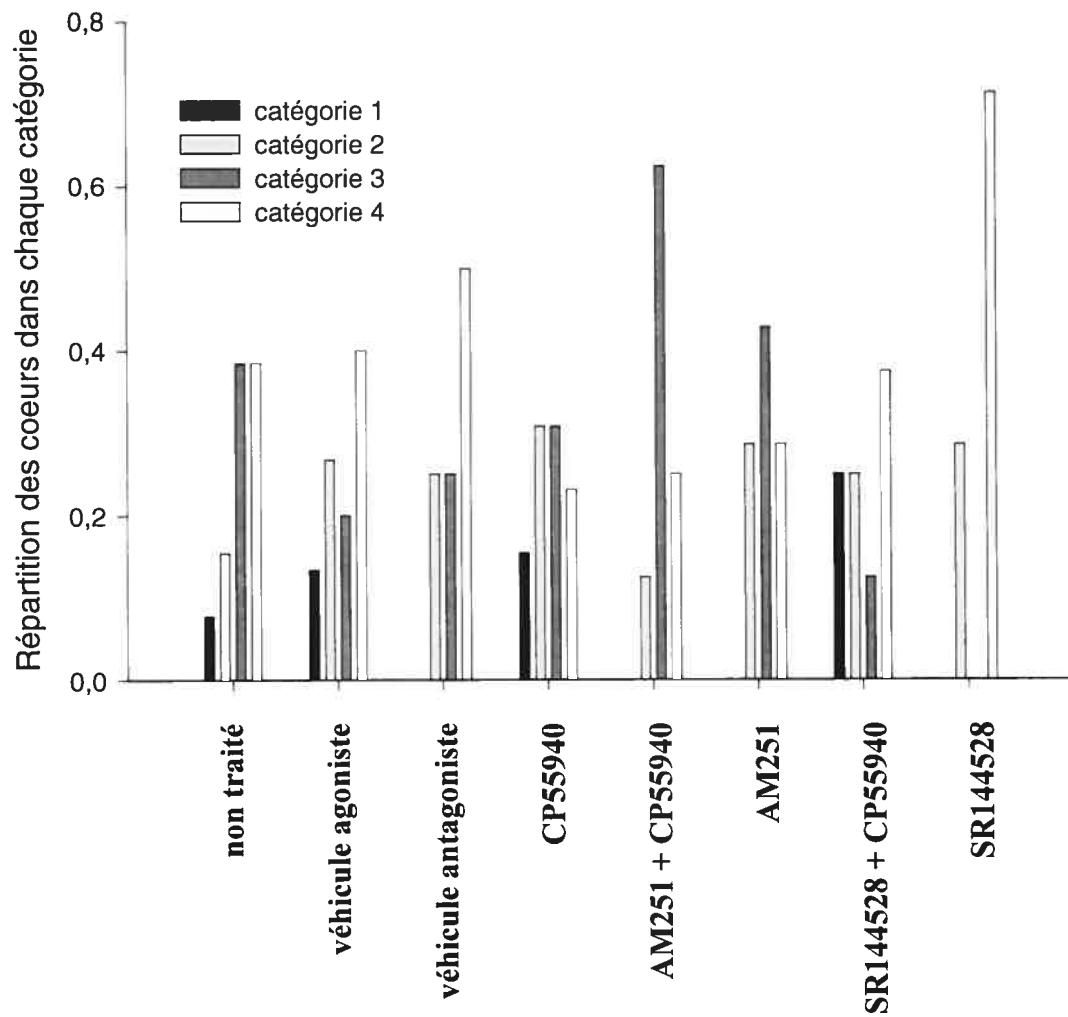


Figure 19. Graphique illustrant la sévérité des arythmies à l'aide d'un classement en quatre catégories pour chacun des groupes étudiés. catégorie 1 : aucune tachycardie ventriculaire, catégorie 2 : au moins un épisode de tachycardie ventriculaire, catégorie 3 : au moins un épisode de fibrillation ventriculaire réversible, catégorie 4 : fibrillation ventriculaire fatale.

4.d) Effets cardioprotecteurs des cannabinoïdes endogènes et des molécules de synthèse sur la taille de l'infarctus. Sélectivité et rôle des récepteurs respectifs. Modèle *ex vivo* et *in vivo*.

La réduction de la taille d'infarctus suite à un épisode ischémique démontre bien un effet cardioprotecteur. Nous avons démontré dans ces expériences l'effet cardioprotecteur de différents cannabinoïdes, tant endogènes que synthétiques sur la taille de l'infarctus dans deux modèles différents, à savoir le modèle de perfusion *ex vivo* selon Langendorff et le modèle *in vivo* d'ischémie régionale complète transitoire. Dans la figure 20, on illustre que le PEA et le 2-AG diminuent la taille de l'infarctus (respectivement $13 \pm 3\%$ et $14 \pm 1\%$ de la surface ventriculaire, $p < 0,05$ vs non traité à $37 \pm 4\%$ de la surface ventriculaire) lorsqu'ils sont perfusés à des cœurs soumis à une ischémie globale partielle de 90 minutes à 0,6 ml/min. De même, on montre également, pour deux agonistes sélectifs aux récepteurs CB1 (ACEA, $K_i = 1,4$ nM) ou CB2 (JWH015, $K_i = 13,8$ nM) la concentration minimale effectrice, soit 50 nM, respectivement 30 fois et 3 fois leur K_i . À cette concentration, les deux agonistes ont montré un effet protecteur sur la taille d'infarctus en la réduisant à $16 \pm 3\%$ pour l'agoniste CB1 et $12 \pm 2\%$ pour l'agoniste CB2 ($p < 0,05$ vs non traité).

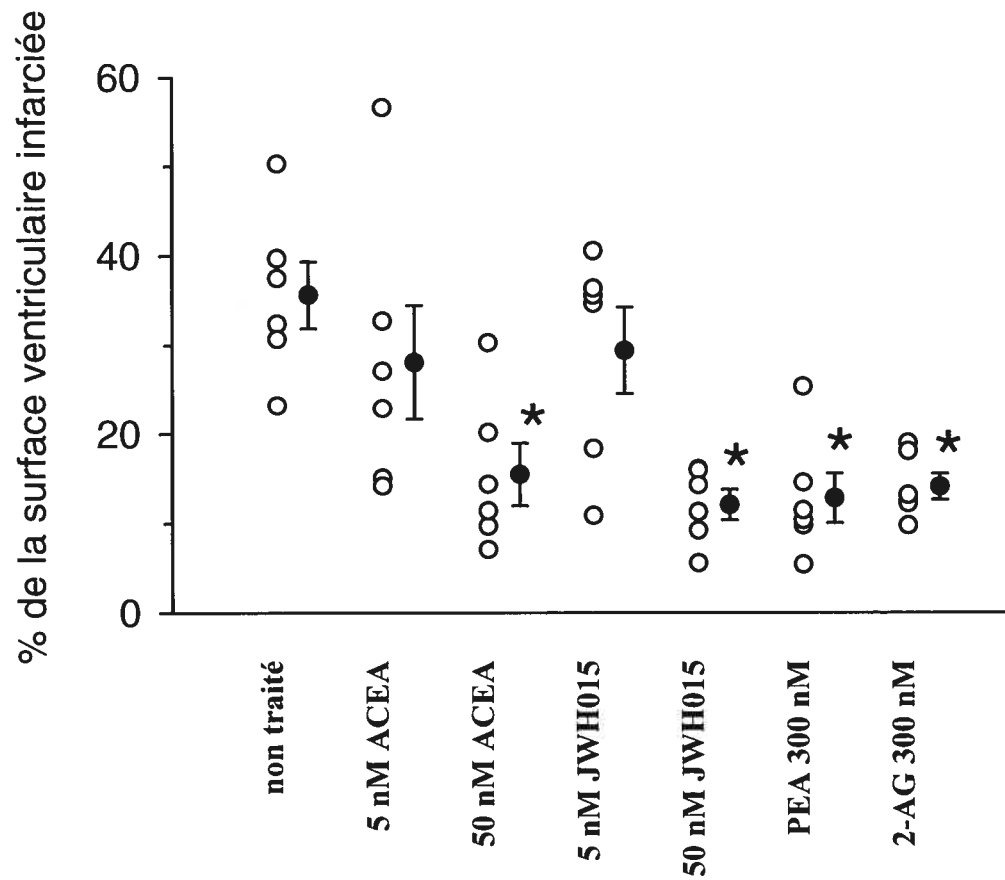


Figure 20. Graphique de la taille d'infarctus pour différents cannabinoïdes après 60 min de reperfusion suivant une ischémie globale partielle de 90 minutes à 0,6 ml/min.

* $p < 0,05$ vs non traité

Dans une autre série d'expériences, montrées dans la figure 21, nous avons procédé à une ischémie plus sévère de 0,4 ml/min pour 90 minutes et nous avons évalué l'effet des agonistes inverses pour les récepteurs CB1 (SR141716A, 100 nM) ou CB2 (SR144528, 100 nM). Nous avons utilisé un agoniste sélectif différent pour le récepteur CB2, soit le JWH133, à une concentration de 10 nM, égale à trois fois son K_i de 3,4 nM.

L'effet protecteur sur la taille de l'infarctus observé pour l'ACEA ($23 \pm 4\%$ de la surface ventriculaire) et le JWH133 ($28 \pm 3\%$ de la surface ventriculaire) dans ce nouveau protocole plus sévère a été reproduit et demeure statistiquement significatif comparativement au groupe non traité ($59 \pm 6\%$ de la surface ventriculaire). Seuls les agonistes inverses sélectifs pour les récepteurs visés par les agonistes sélectifs ont été en mesure de bloquer cet effet protecteur (Figure 21).

Nous avons procédé à l'évaluation de l'effet du moment d'administration de l'agoniste CB2 (JWH133, 10nM) sur la baisse de la taille d'infarctus observée. Le protocole d'administration du JWH133 est le même que celui décrit précédemment dans les expériences de récupération fonctionnelle. Contrairement aux résultats observés pour la récupération fonctionnelle, le moment d'administration par lui-même n'a eu aucun effet sur la baisse de la taille de l'infarctus et celle-ci était inférieure à celle du groupe non traité chez tous les groupes étudiés (pré ischémie $30 \pm 6\%$ de la surface ventriculaire, pendant ischémie $26 \pm 4\%$ ou post ischémie $31 \pm 3\%$, $p < 0,05$ vs non traité $50 \pm 6\%$) (Figure 22).

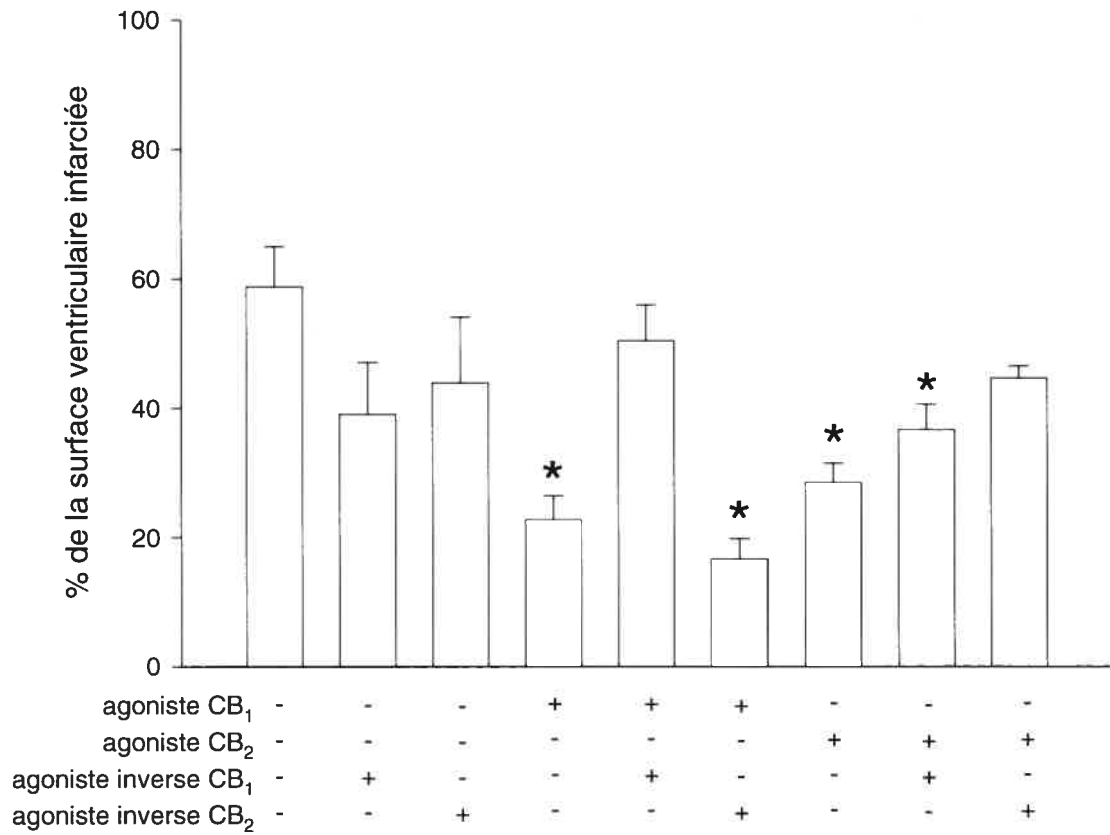


Figure 21. Graphique de la taille d'infarctus en fonction de l'agoniste CB₁ (ACEA, 50 nM) ou CB₂ (JWH133, 10 nM) avec ou sans agoniste inverse CB₁ (SR141716A, 100 nM) ou CB₂ (SR144528, 100 nM) après 60 min de reperfusion suivant une ischémie de 90 min à 0,4 ml/min. * $p < 0,05$ vs non traité

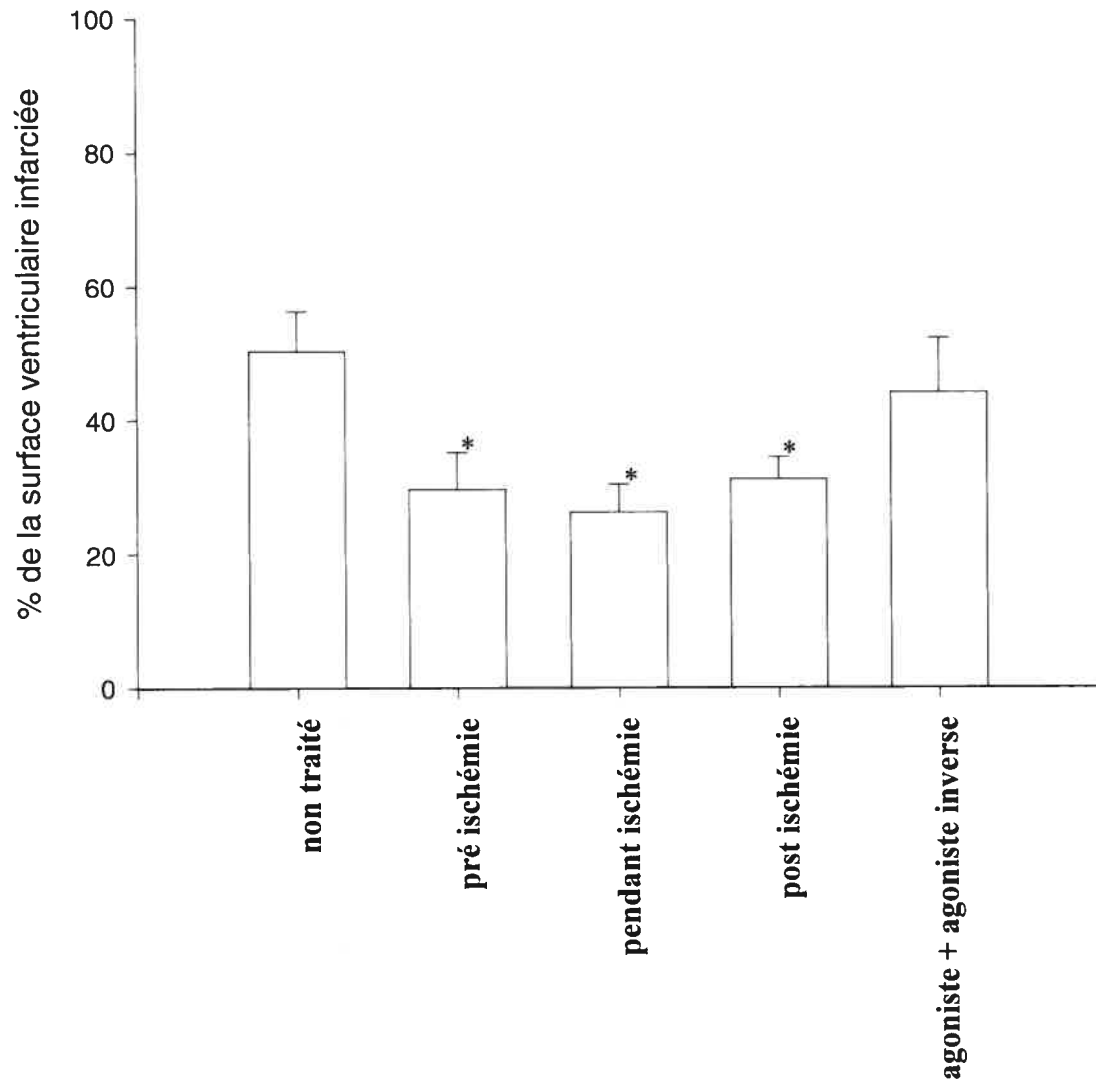


Figure 22. Graphique de la taille d'infarctus en fonction du moment d'administration de l'agoniste CB2 (JWH133, 10 nM) soit pendant 15 min avant l'ischémie, pendant les 90 min d'ischémie ou pendant les 60 min de reperfusion suivant une ischémie de 90 min à 0,4 ml/min. * $p < 0,05$ vs non traité

Dans le modèle *in vivo* d'ischémie régionale transitoire, l'agoniste non sélectif CP55940 (0,1 mg/kg, IV) a provoqué une baisse significative de la taille de l'infarctus en fonction de la zone à risque ($31 \pm 5\%$ de la zone à risque, $p < 0,05$ vs non traité $49 \pm 4\%$). Le prétraitement avec l'agoniste inverse pour le récepteur CB1 (AM251, 1 mg/kg IP) est resté sans effet ($23 \pm 4\%$ de la zone à risque, $p < 0,05$ vs non traité) alors que celui avec l'agoniste inverse pour le récepteur CB2 (SR144528, 1 mg/kg IP) a bloqué cet effet ($45 \pm 5\%$ de la zone à risque, $p = \text{NS}$ vs non traité). Les agonistes inverses seuls (AM251, $37 \pm 5\%$ de la zone à risque et SR144528, $31 \pm 25\%$) de même que les véhicules (véhicule agoniste, $49 \pm 3\%$ de la zone à risque et véhicule agoniste inverse, $46 \pm 4\%$) sont restés sans effet (Figure 23).

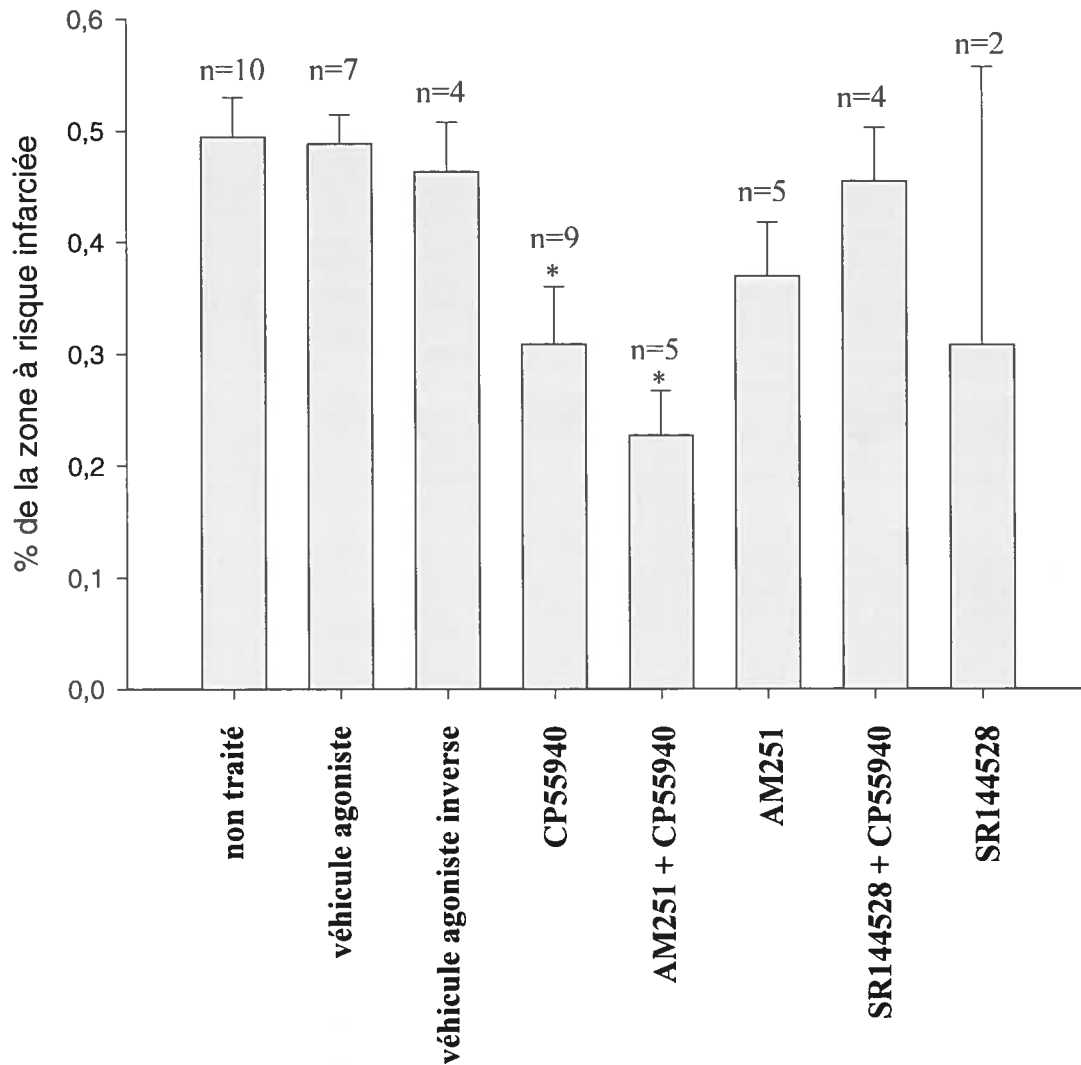


Figure 23. Graphique de la taille de l'infarctus en fonction de la zone à risque dans un modèle *in vivo* d'ischémie régionale. Les agonistes inverses pour le récepteur CB1 (AM251, 1 mg/kg) et CB2 (SR144528, 1 mg/kg) ont été injectés IP, de même que leur véhicule et l'agoniste non sélectif CP55940 (0,1 mg/kg) a été administré par une perfusion IV rapide pendant 20 secondes de même que son véhicule seul. * $p < 0,05$ vs non traité

4.e) Voies de signalisations impliquées. Études avec inhibiteurs pharmacologiques et PEA. Immunobuvardage de type Western. Essai kinase.

Nous avons déjà montré l'effet protecteur du PEA sur la récupération de la contractilité ventriculaire à la reperfusion. Nous nous attardons ici sur l'effet de différents inhibiteurs pharmacologiques pour les voies de signalisation PKC (chélérythrine, 1 μ M), ERK 1/2 (PD98059, 5 μ M) et p38 MAPK (SB203580, 5 μ M) sur cet effet protecteur. Les inhibiteurs pharmacologiques ont été perfusés 15 minutes avant le début de l'ischémie et durant les 120 minutes qu'a duré l'ischémie globale partielle à 0,5 ml/min. L'inhibition de l'effet protecteur est statistiquement significatif ($p < 0,05$) dès la première minute de reperfusion et maintenue pour toute la durée de celle-ci (20 min) pour les groupes traités avec le SB203580 ou la chélérythrine. Le PD98059 inhibe partiellement l'effet protecteur mais n'atteint pas le seuil significatif ($0,05 < p < 0,1$) (Figure 24).

L'inhibiteur de la p38 MAPK (SB203580) est le seul à avoir bloqué l'effet protecteur du PEA sur l'élévation de la pression diastolique dès la première minute de reperfusion et durant toute la durée de celle-ci (élévation de 45 ± 8 mm Hg, $p < 0,05$ vs PEA avec une élévation de 16 ± 4 mm Hg à 20 minutes) (Figure 25).

L'effet des différents inhibiteurs sur la réduction de la taille de l'infarctus conférée par le PEA s'apparente à celui sur la récupération de la contractilité ventriculaire. L'inhibiteur de

la p38 MAPK (SB203580, $50 \pm 8\%$ de la surface ventriculaire) et de la PKC (chélérythrine, $40 \pm 10\%$ de la surface ventriculaire) ont significativement bloqué l'effet protecteur du PEA ($20 \pm 6\%$ de la surface ventriculaire) alors que l'inhibiteur de ERK1/2 a bloqué de façon partielle cet effet ($35 \pm 5\%$ de la surface ventriculaire, $p < 0,1$) (Figure 26). Les inhibiteurs seuls (chélérythrine : $37 \pm 11\%$ de la surface ventriculaire, PD98059 : $57 \pm 13\%$ et SB203580 : $52 \pm 14\%$) sont restés sans effet lorsque comparés au groupe non traité ($48 \pm 5\%$ de la surface ventriculaire).

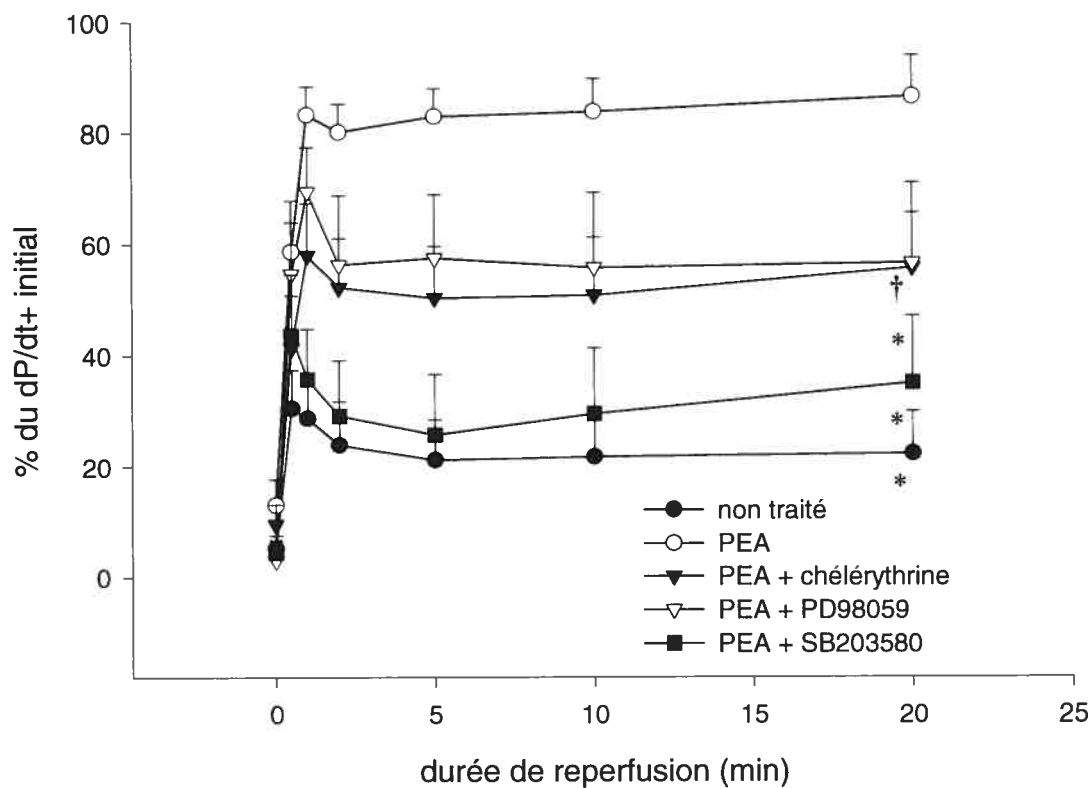


Figure 24. Récupération de la contractilité ventriculaire (dP/dt^+) à la reperfusion après une ischémie de 120 min à 0,5 ml/min suite à un traitement avec le PEA (300 nM) seul ou précédé d'un inhibiteur pharmacologique des voies de signalisation PKC (chélerythrine, 1 μ M), p38 MAPK (SB203580, 5 μ M) ou ERK1/2 (PD98059, 5 μ M).

* $p < 0,05$ vs PEA, † $p < 0,1$ vs PEA

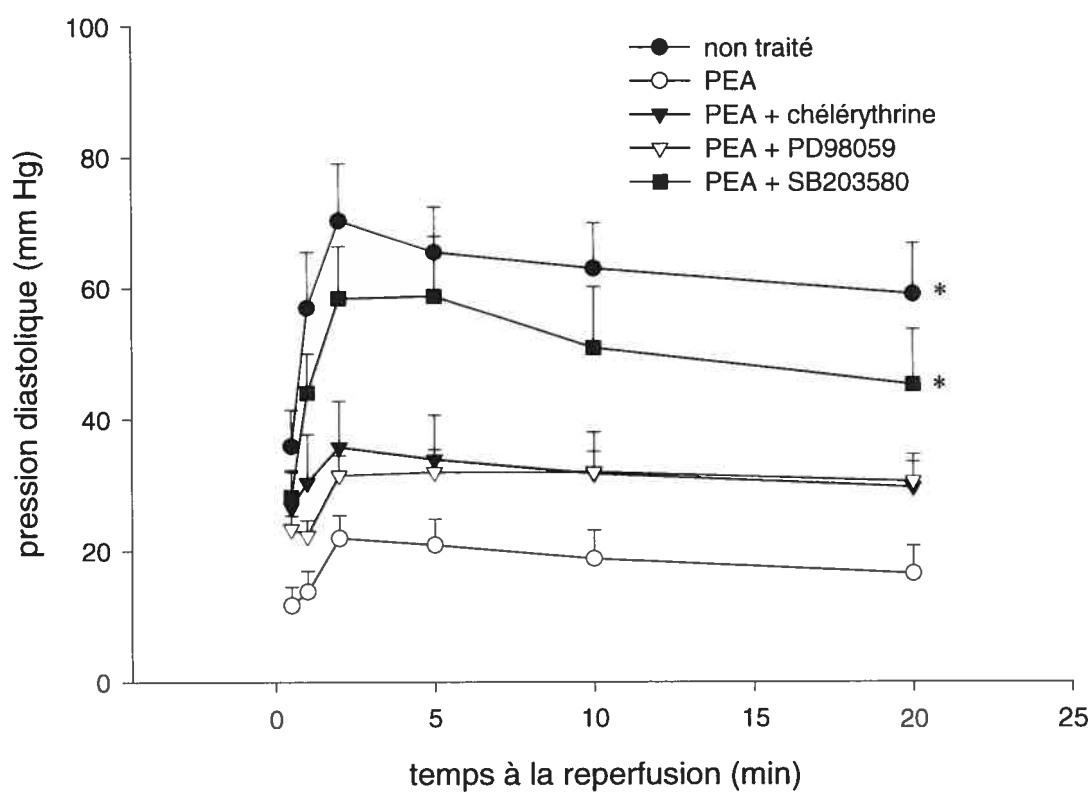


Figure 25. Effet du PEA et des inhibiteurs sur l'élévation de la pression diastolique ventriculaire gauche (LVDP) à la reperfusion après une ischémie de 120 min à 0,5 ml/min suite à un traitement avec le PEA (300 nM) seul ou précédé d'un inhibiteur pharmacologique des voies de signalisation PKC (chélerythrine, 1 μ M), p38 MAPK (SB203580, 5 μ M) ou ERK1/2 (PD98059, 5 μ M).

* $p < 0,05$ vs PEA

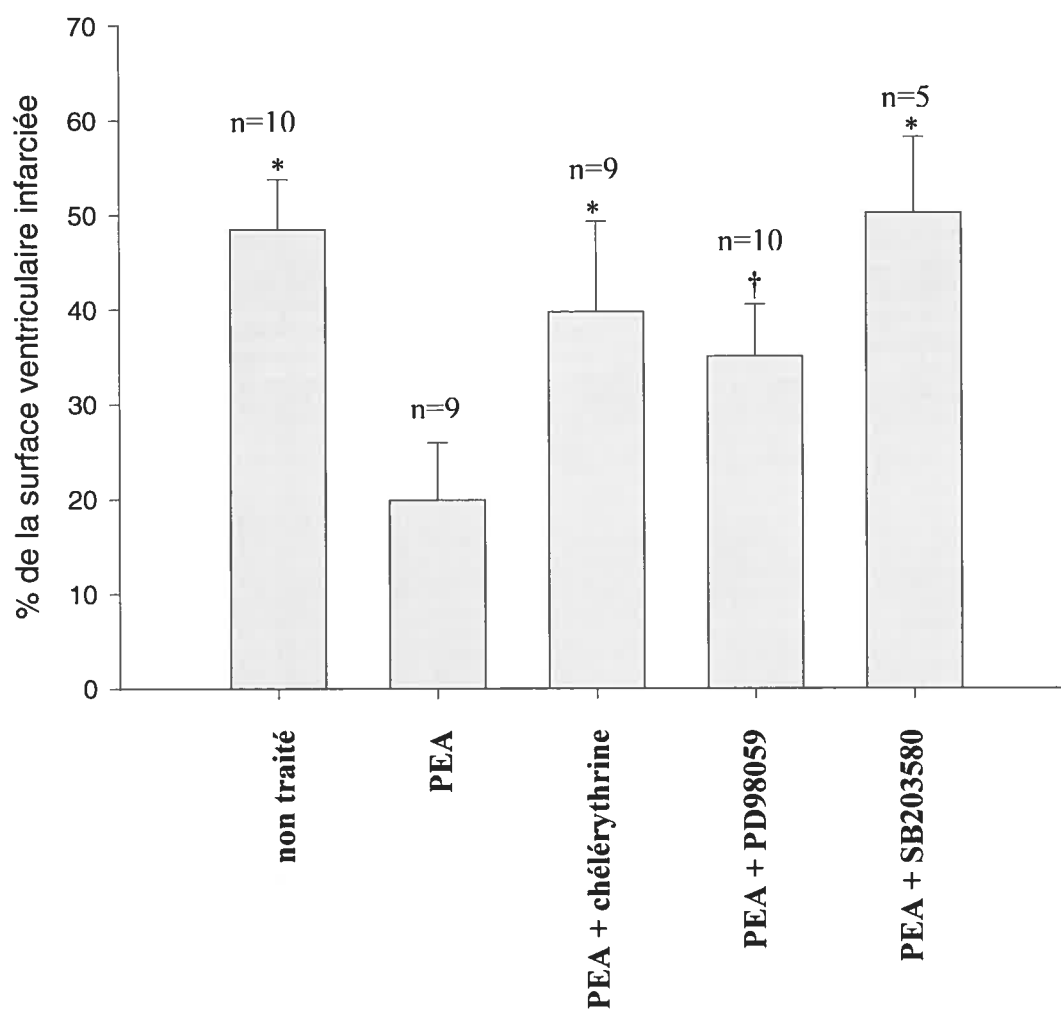


Figure 26. Graphique de la taille de l'infarctus exprimée en % de la surface ventriculaire après 60 min de reperfusion suivant une ischémie de 120 min à 0,5 ml/min suite à un traitement avec le PEA (300 nM) seul ou précédé d'un inhibiteur pharmacologique des voies de signalisation PKC (chébérythrine, 1 μ M), p38 MAPK (SB203580, 5 μ M) ou ERK1/2 (PD98059, 5 μ M). * $p < 0,05$ vs PEA, † $p < 0,1$ vs PEA

L'extraction de protéine et l'immunobuvardage avec des anticorps spécifiques aux trois principales familles de MAPK, ainsi qu'à leurs formes phosphorylées a permis d'observer la phosphorylation de la p38, p44/42 (ERK1/2) et p54/46 (JNK) MAPK. Nous montrons dans la figure 27 un exemple de gel illustrant les formes phosphorylées et totales des kinases sus mentionnées à différents temps du protocole d'ischémie reperfusion (ischémie de 120 minutes à 0,5 ml/min suivie d'une reperfusion de 60 minutes).

Le tableau 5, quant à lui, quantifie le taux de phosphorylation en le comparant à un taux basal attribué à des cœurs non traités soumis à une perfusion de 15 minutes sans ischémie. Dans ce tableau, on remarque une hausse de la phosphorylation de ERK1/2 pendant la perfusion suite à un traitement avec le PEA. On observe aussi une phosphorylation accrue de la p38 MAPK et une baisse de celle de JNK pendant l'ischémie causée par le traitement avec le PEA. La phosphorylation de ERK1/2 à la reperfusion est aussi rapportée tant chez les groupes traités et non traités et le PEA semble montrer une tendance vers une phosphorylation plus importante que chez le groupe non traité.

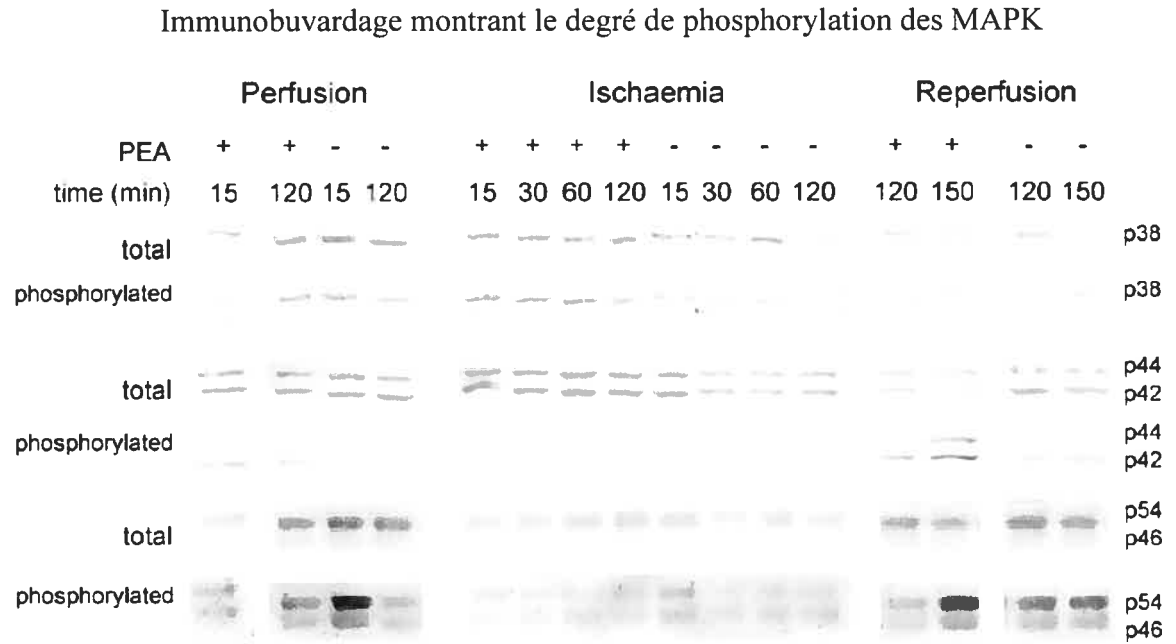


Figure 27 Gel typique montrant la protéine totale ainsi que sa forme phosphorylée pour la p38 MAPK, la p44/42 MAPK (ERK 1/2) et la p54/46 MAPK (JNK)

Tableau 5. Degré de phosphorylation de la p38 MAPK, ERK 1/2 et JNK kinases

	perfusion	ischémie 0,5 ml/min	reperfusion
p38 MAPK			
non traité	97 ± 5 %	123 ± 14 %	123 ± 12 %
PEA (300 nM)	110 ± 11 %	139 ± 11 % *	128 ± 11 %
ERK 1/2			
non traité	112 ± 21 %	121 ± 13 %	387 ± 54 % *
PEA (300 nM)	199 ± 20 %	76 ± 14 %	953 ± 248 % *
JNK			
non traité	107 ± 9 %	89 ± 8 %	143 ± 23 %
PEA (300 nM)	99 ± 12 %	65 ± 6 % *	142 ± 27 %

* $p < 0,05$ vs valeur de base mesuré après une perfusion de 15 minutes avec un tampon Krebs-Henseleit et arbitrairement fixé à 100 % n = 3

Après avoir démontré l'importance de la p38 MAPK et de ERK1/2, nous avons voulu évaluer la contribution de chacun des récepteurs CB1 et CB2 dans l'activation de ces deux MAPK. À l'aide des deux mêmes agonistes sélectifs des récepteurs CB1 (ACEA, 50 nM) ou CB2 (JWH133, 10 nM), nous avons procédé à l'extraction de protéines, l'immunobuvardage avec les mêmes anticorps spécifiques aux formes phosphorylées de p38 MAPK et ERK1/2 de même qu'à l'évaluation de l'activité enzymatique par un essai kinase spécifiques pour la p38 MAPK et la p44 MAPK (Figure 28). L'agoniste CB2 a été celui qui a provoqué la plus forte phosphorylation et augmentation de l'activité kinase de p38 après 60 minutes de perfusion et les deux agonistes ont été en mesure d'annuler la baisse de phosphorylation et d'activité de p38 observé pendant l'ischémie dans le groupe non traité. Comparativement, c'est l'agoniste CB1 qui a provoqué la plus importante phosphorylation et activité kinase tant chez p42 que p44 après 60 minutes de perfusion et 20 minutes de reperfusion après l'ischémie.

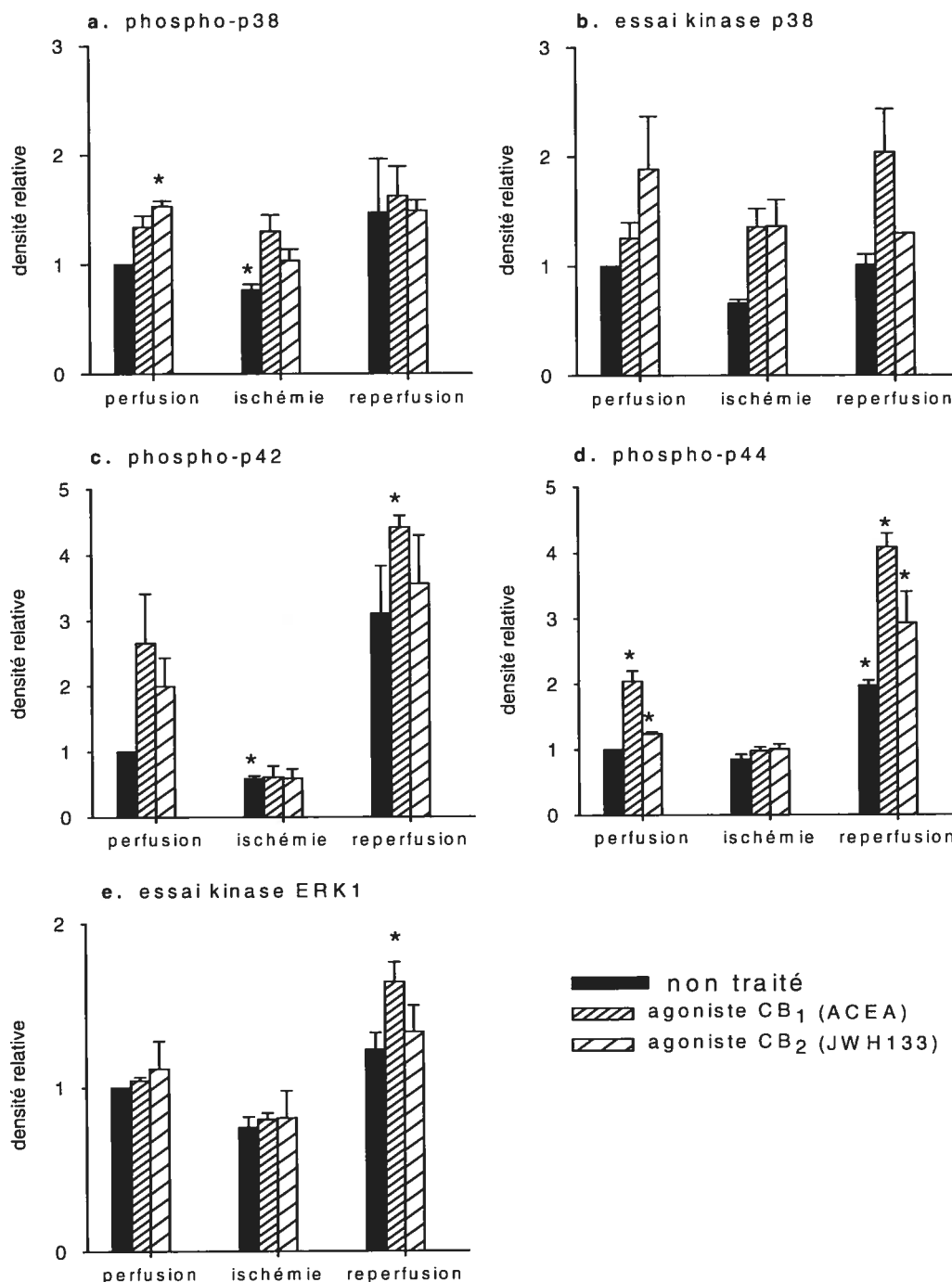


Figure 28. Degré de phosphorylation et activité kinase de la p38 et la p44/42 MAPK après 60 min de perfusion, 60 min d'ischémie ou 20 min de reperfusion suivant 90 min d'ischémie avec ou sans agoniste CB₁ (ACEA, 50 nM) ou CB₂ (JWH133, 10 nM). La densité relative est évaluée en comparaison avec un cœur non traité soumis à une perfusion de 60 min. * $p < 0,05$ vs valeur basale fixée à 1

4.f) Rôle du NO dans l'effet cardioprotecteur. Évidence pharmacologique. Évidence moléculaire.

Nous avons mentionné précédemment les premières expériences qui ont suggéré un lien entre le monoxyde d'azote (NO) et les propriétés des récepteurs cannabinoïdes. Nous montrons dans la figure 29a l'effet d'un inhibiteur de la synthèse de NO, le N-nitro-L-arginine (NNLA) sur les propriétés cardioprotectrices de quelques cannabinoïdes. On y constate que le NNLA inhibe les propriétés cardioprotectrices du PEA et de l'ACEA mais pas celles du 2-AG et du JWH-015. Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'expression de la protéine iNOS suite au traitement avec un agoniste sélectif pour l'un ou l'autre récepteur cannabinoïde. On y remarque que la protéine a été identifiée suite à la perfusion de l'ACEA et ce, pendant la perfusion, l'ischémie ou la reperfusion, alors que l'on remarque la présence de cette protéine suite au traitement avec le JWH133 seulement pendant l'ischémie (Figure 29b). Notons au passage la présence de la protéine iNOS à la reperfusion dans le groupe non traité.

Par la suite, nous avons évalué l'effet du NNLA sur la récupération de la contractilité ventriculaire à la reperfusion des cœurs traités avec un agoniste sélectif aux récepteurs CB1 (ACEA, 50 nM) ou CB2 (JWH015, 50 nM). Le NNLA est resté sans effet chez le groupe traité avec le JWH015 mais a provoqué une augmentation de la récupération fonctionnelle chez le groupe traité avec l'ACEA (Figure 30).

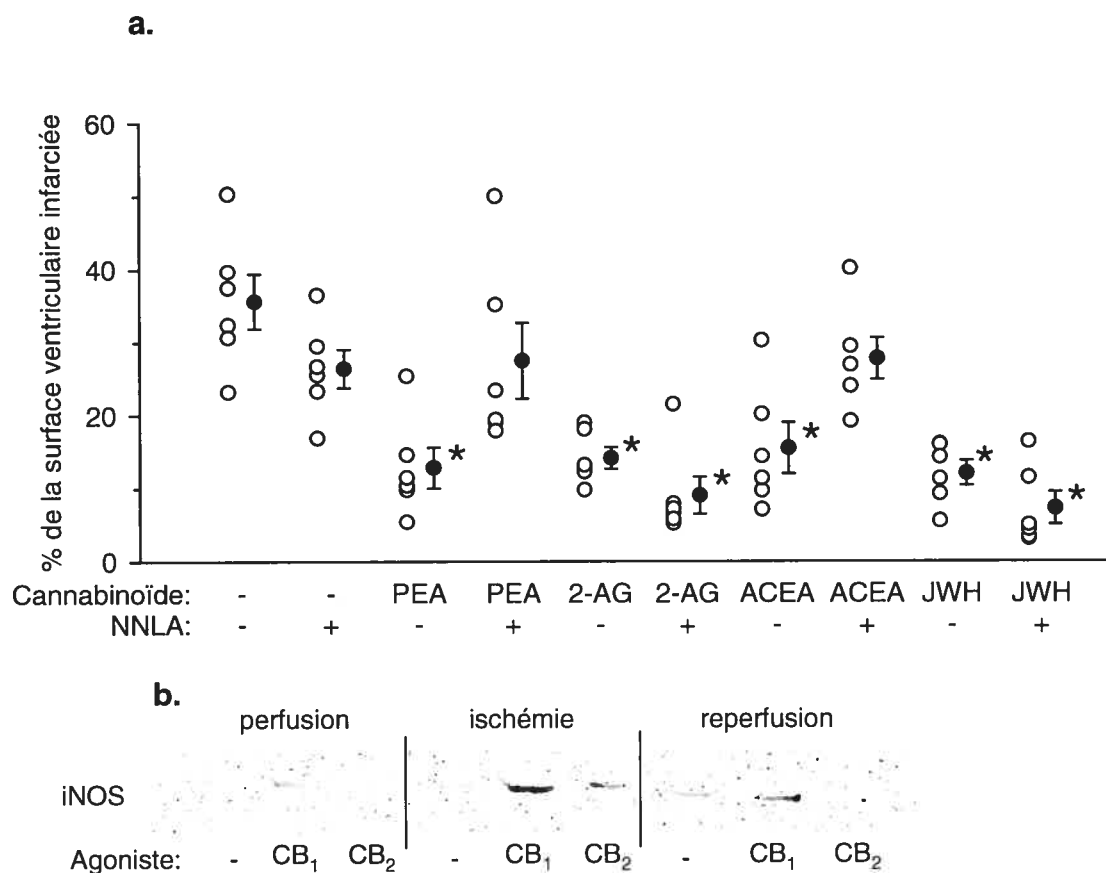


Figure 29 **a** : Taille d'infarctus mesuré suite au traitement avec un endocannabinoïde (PEA, 300 nM, ou 2-AG, 300 nM), un agoniste CB₁ (ACEA, 50 nM) ou CB₂ (JWH015, 50 nM) avec ou sans inhibiteur de la NOS (NNLA, 30 μ M) après 60 min de reperfusion suivant une ischémie de 90 min à 0,6 ml/min. * $p < 0,05$ vs non traité **b** : Immunobuvardage de la protéine NOS de type 2 (iNOS) pendant une perfusion de 60 min, une ischémie de 60 min à 0,4 ml/min, ou une reperfusion de 20 min suivant une ischémie de 90 min avec ou sans agoniste CB₁ (ACEA, 50 nM) ou CB₂ (JWH133, 10 nM)

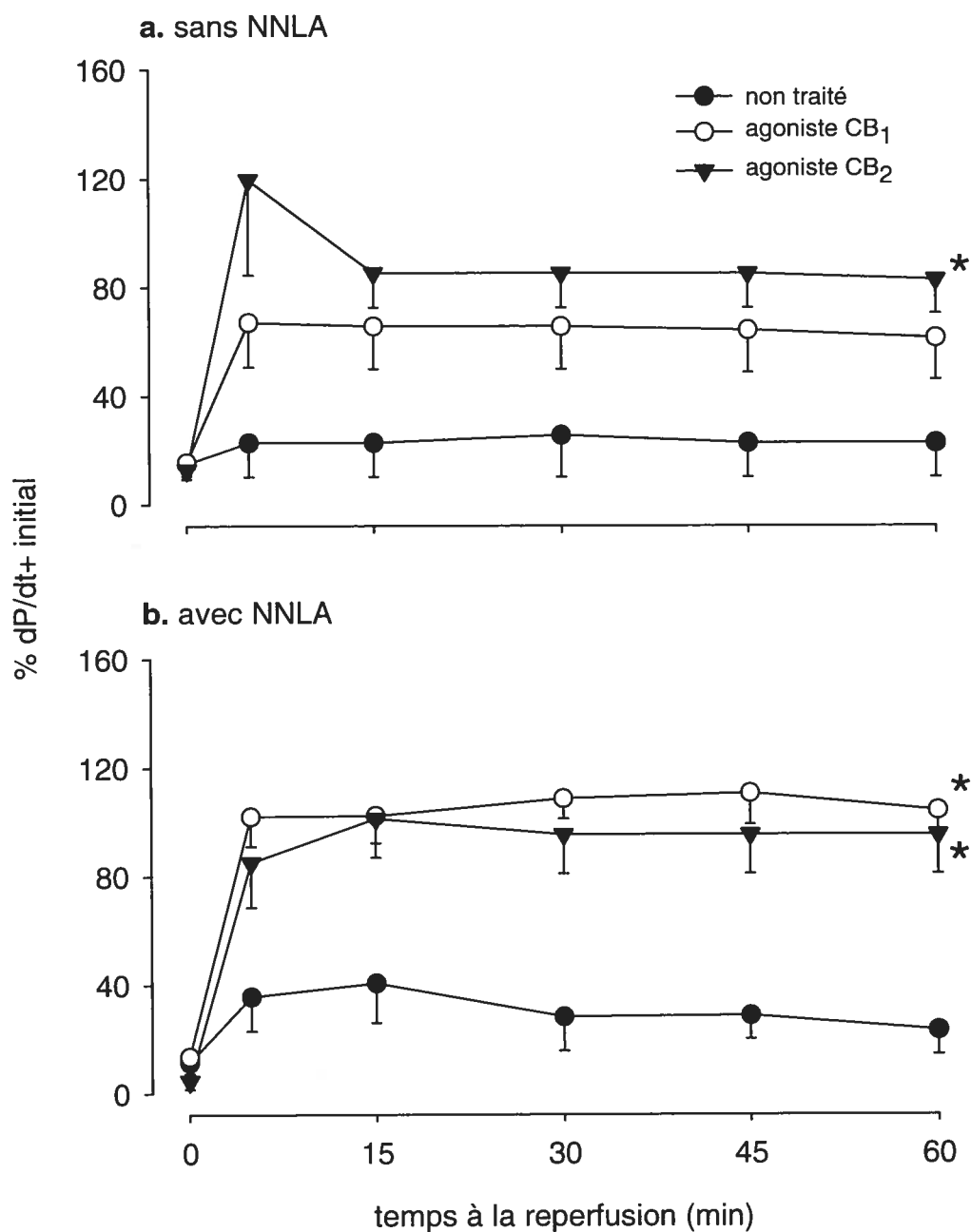


Figure 30. Récupération de la contractilité ventriculaire (dP/dt^+) lors de la reperfusion suite à une ischémie de 90 min à 0,6 ml/min pour des agonistes sélectifs aux récepteurs CB₁ (ACEA, 50 nM) ou CB₂ (JWH015, 50 nM) en absence (a) ou en présence (b) d'un inhibiteur de la synthèse du monoxyde d'azote (NNLA, 30 μ M) * $p < 0,05$ vs non traité

4.g) Rôle des HSP 27 et 70

Nous avons évalué la quantité relative des protéines HSP27 et HSP70 par immunobuvardage ainsi que la phosphorylation de la protéine HSP27 sur les sérines 15, 78 et 82 à l'aide d'anticorps commerciaux. Nous n'avons pu déterminer la présence d'une forme phosphorylée de HSP27 dans les protocoles étudiés. La quantité relative de la HSP70 en comparaison à un taux d'expression basal mesuré dans un cœur non traité soumis à une perfusion de 15 minutes montre une augmentation suite à la perfusion d'un agoniste CB2 (JWH133, 10 nM, $p < 0,05$ vs non traité). L'expression de la HSP70 est supérieure au taux basal durant l'ischémie chez tous les groupes étudiés et reste élevé pendant la reperfusion chez le groupe non traité et chez le groupe traité avec l'agoniste CB2 ($p < 0,05$) (Figure 31).

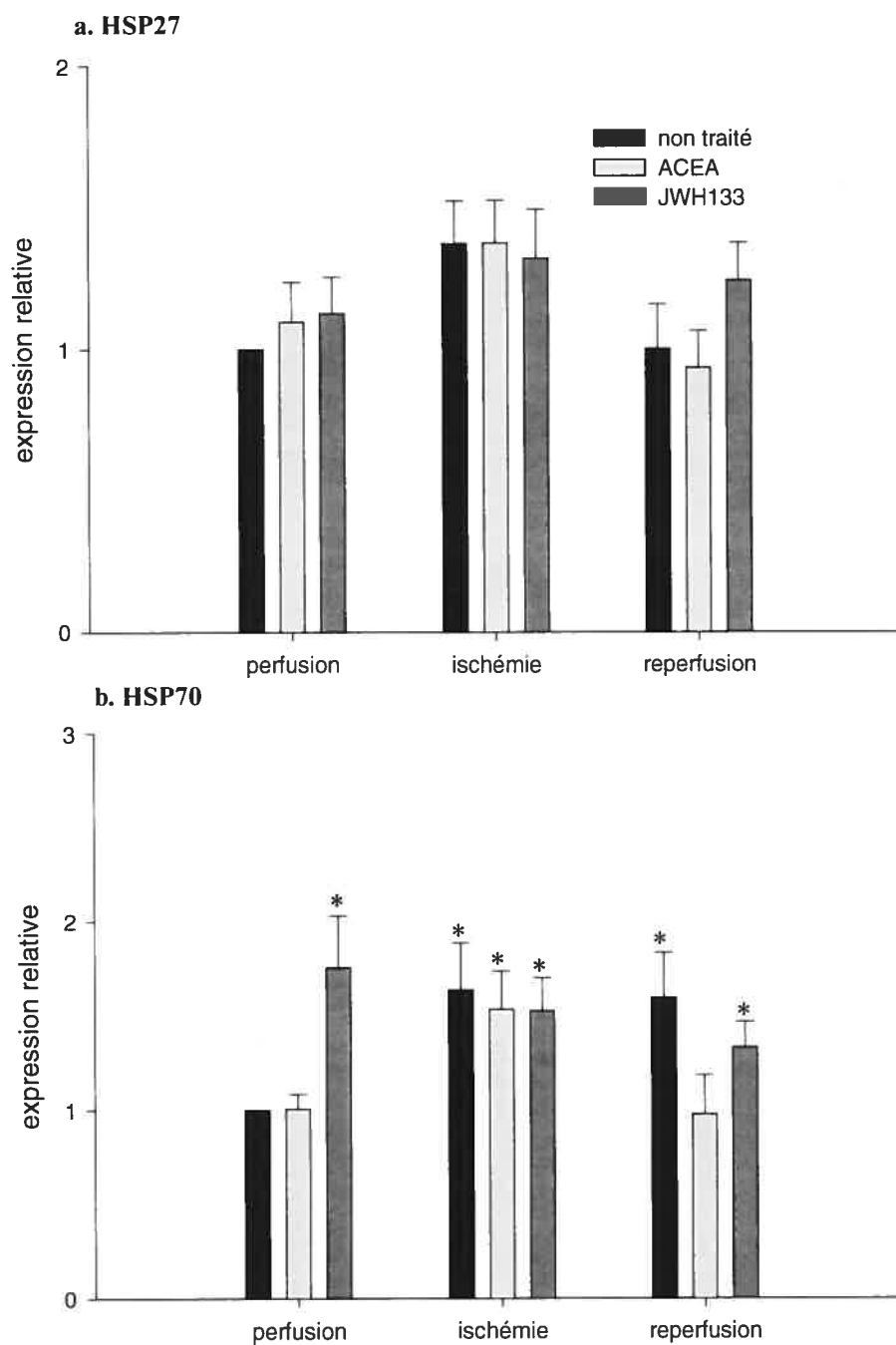


Figure 31. Expression relative des protéines HSP27 et HSP70 pendant un protocole de perfusion (60 min), d'ischémie (60 min) ou d'ischémie (90 min) suivie d'une reperfusion (20 min). * $p < 0,05$ vs valeur basale

5. Discussion

5.a) Modèles animaux

En choisissant de travailler sur un modèle cardiaque d'ischémie reperfusion, deux méthodologies s'offraient principalement à nous soit un modèle *ex vivo* d'ischémie par une rétroperfusion sur un modèle de Langendorff ou un modèle *in vivo* sur un animal anesthésié. Nous avons expérimenté ces deux méthodes dans la présente. Le modèle selon Langendorff offre l'avantage d'étudier le cœur comme un tout, de façon indépendante des autres organes et systèmes avec lesquels il est d'ordinaire en relation. Il est ainsi plus facile d'observer un effet d'une substance sur la contractilité ou la fréquence cardiaque. De plus, détaché de l'organisme, le cœur n'a plus la responsabilité de perfusion et de maintien de la vie. Sa perfusion et son apport en oxygène et en nutriments dans les artères coronaires sont assurés par la pompe péristaltique. La présence, la fréquence ainsi que la sévérité d'éventuelles arythmies en cours d'expérimentation a donc beaucoup moins d'impact sur la survie des cardiomyocytes. La sévérité et la durée de l'épisode ischémique doivent être plus importantes pour provoquer un infarctus de taille appréciable en comparaison au modèle *in vivo*. De plus, il est possible d'effectuer plus d'expériences dans un tel modèle, ce qui permet d'étudier plusieurs avenues et tester plus d'hypothèses qu'avec un modèle *in vivo*.

Nous avons choisi de travailler avec des protocoles d'ischémie globale partielle, qui offrent l'avantage de pouvoir perfuser des principes actifs de façon constante dans tout le myocarde pendant toute la durée de l'ischémie. Puisque la durée de l'ischémie varie entre 90 et 120 minutes dans les protocoles décrits, on ne pourrait envisager une administration ponctuelle pré ischémie d'une molécule ayant une demie vie de quelques minutes. Il est connu que plusieurs cannabinoïdes endogènes (AEA, PEA, 2-AG, OEA) subissent rapidement un catabolisme par l'enzyme *fatty acid amid hydrolase* (FAAH)(64). Le 2-AG subit en outre le catabolisme par la famille d'enzymes *monoacylglycérol lipases* (MAGLs)(74).

Dans les résultats présentés, nous retrouvons principalement trois protocoles d'ischémie dans le modèle *ex vivo*. Le premier protocole, une ischémie globale partielle de 120 minutes à un débit de 0,5 ml/min, a provoqué un infarctus correspondant à environ $48 \pm 5\%$ de la surface ventriculaire chez le groupe non traité. Le deuxième, une ischémie de 90 minutes à 0,6 ml/min, a provoqué un infarctus moins sévère, soit $37 \pm 4\%$ de la surface ventriculaire. Dans le troisième protocole, une ischémie de 90 minutes à 0,4 ml/min, deux expérimentateurs ont obtenu des résultats légèrement différents, soit $50 \pm 6\%$ et $59 \pm 6\%$ de la surface ventriculaire infarctée. Il devient plus difficile de détecter un effet protecteur sur la taille de l'infarctus dans un protocole, tel le deuxième, qui cause un dommage moindre et cela devient encore plus évident lorsque l'on étudie l'effet d'inhibiteurs sur cette substance protectrice. Cependant, comme c'est le cas dans le troisième protocole, où le dommage

cellulaire est important, la récupération fonctionnelle est erratique et la dispersion est telle qu'il devient alors difficile de démontrer un effet pharmacologique d'un point de vue statistique. En effet, la récupération fonctionnelle chez le groupe non traité soumis au troisième protocole nous montre une récupération de l'ordre de $10 \pm 4\%$ du dP/dt initial tandis que chez le même groupe soumis au deuxième protocole, la récupération se situe plutôt à environ $22 \pm 12\%$ du dP/dt initial. Nous parvenons ainsi à obtenir une bien meilleure récupération fonctionnelle avec les agonistes à l'étude, à savoir l'ACEA ($61 \pm 15\%$) et JWH015 ($83 \pm 12\%$).

Puisque l'évaluation de la surface infarctée se fait de façon subjective, l'impact des expérimentateurs, pour un même protocole, est considérable. Ainsi, chaque expérimentateur doit réaliser son propre groupe témoin et les données provenant de différents expérimentateurs ne devraient pas être regroupées afin de minimiser le biais humain.

Le modèle *in vivo* d'ischémie régionale complète transitoire, bien que plus fastidieux, offre certes l'avantage de mimer avec plus d'exactitude un épisode d'ischémie cardiaque transitoire ou d'infarctus du myocarde, rencontré dans la population. Contrairement au modèle d'ischémie à faible débit, où un débit, aussi faible soit-il, peut contribuer à libérer le cœur des métabolites potentiellement néfastes pour sa survie, dans un modèle d'ischémie régionale où l'on effectue une ligature complète d'une artère, l'accumulation de métabolites

en aval de la ligature contribue au dommage myocardique. De plus, la contractilité cardiaque est diminuée dans les deux premières minutes de l'ischémie(129), affectant du même coup la perfusion du corps entier. Dans le modèle *in vivo*, la survie de l'animal est un facteur important à considérer et un pré requis à l'évaluation d'une taille d'infarctus. Il faut rappeler que ce n'est pas l'ischémie qui souvent est fatale mais bien l'instabilité électrique en découlant. Chez l'homme, environ 20% des patients subissant un infarctus du myocarde meurent moins de deux heures après le début des symptômes(129). Chez les survivants, entre 80 et 90% d'entre eux subiront des complications dont la principale est diverses formes d'arythmies cardiaques (incidence de 75 à 95% parmi les cas ayant des complications)(129). Dans le groupe traité seulement avec l'agoniste inverse SR144528 sélectif au récepteur CB2, seulement deux animaux ont survécu sur les sept soumis au protocole, soit 28,5%. Il devient alors évident que l'on ne peut conclure de façon satisfaisante en comparant ce groupe sur la base de tests statistiques aux autres groupes.

Dans un modèle *in vivo*, l'influence des autres systèmes biologiques est nécessairement prise en compte. Ainsi, la stimulation du tonus sympathique et la relâche des amines sympathomimétiques par les glandes surrénales, de même que la réaction inflammatoire cardiaque, sont présentes dans le protocole d'ischémie *in vivo*, contrairement au modèle *ex vivo*. Ce modèle offre la possibilité d'étudier les propriétés immunomodulatrices des cannabinoïdes dans le cadre d'une ischémie-reperfusion et d'en apprécier l'impact global. Nous avons aussi la possibilité d'explorer les effets des cannabinoïdes sur la récupération à

long terme puisqu'il est possible de prolonger le protocole *in vivo* en terminant la procédure chirurgicale par des points de suture pour refermer la plaie thoracique et en assurant une analgésie adéquate à l'animal.

C'est certainement la diversité des approches expérimentales qui assure la justesse des conclusions émises.

5.b) Récepteurs

L'identification de l'ARN messenger dans un tissu, pour un récepteur donné, ne constitue pas en soi une preuve de l'expression de la protéine et d'un éventuel rôle physiologique. Il est important de combiner une telle observation avec l'identification de la protéine d'intérêt lorsque les techniques et les connaissances le permettent. Il est plus aisé de synthétiser une paire d'amorces pour effectuer une réaction de RT-PCR sur l'ARNm que de purifier un anticorps efficace pour identifier la protéine en question. Dans le cas du récepteur CB1, sa présence est généralement acceptée sur l'endothélium des vaisseaux sanguins(94;130). Cependant, la présence du récepteur CB2 au niveau du myocarde a longtemps été controversée puisque plusieurs auteurs n'ont pas identifié l'ARNm du récepteur CB2 dans le cœur(58). Lorsque Munro *et al.* a publié les premières amorces ayant servi à identifier le récepteur CB2(78), une inversion s'est glissée dans le dernier codon de l'amorce 3' (5'-TAG-GTA-GGA-GAT-CAA-**GCG**-3'). D'autres ont cité Munro avec les mêmes amorces(131). En comparant les amorces à la séquence ARNm des deux récepteurs CB1 et CB2 (fournie en annexe), nous avons corrigé la séquence de l'amorce 3' du récepteur CB2 faisant défaut (5'-TAG-GTA-GGA-GAT-CAA-**CGC**-3'). Nous avons pu clairement identifier l'ARNm du récepteur CB2 de même que celle du récepteur CB1 dans le ventricule de rat.

Nous avons confirmé la présence de la protéine avec deux anticorps provenant de sources différentes pour chaque récepteur et avons localisé ces récepteurs par immunohistochimie dans le ventricule. Deux isoformes du récepteur CB1 (CB1 et CB1a) ont cependant été décrites tant chez l'humain que chez le rat(132;133). L'isoforme CB1a serait le résultat d'un épissage alternatif et résulterait en une forme tronquée d'environ 61 acides aminés en N-terminal. Les deux isoformes ont cependant été identifiées dans le cœur de rat(133) et leur ratio d'expression serait de 11 pour 1 en faveur de l'isoforme CB1. Puisque nous avons opté pour un anticorps ciblant la partie N terminale, nous ne pouvons affirmer que l'isoforme CB1a a la même distribution puisque l'anticorps ne pouvait théoriquement le reconnaître.

Nous avons décrit une distribution différente des récepteurs CB1 après un épisode d'ischémie reperfusion telle qu'observée suite aux expériences d'immunohistochimie alors que nous n'avions pu rapporter de changement dans les expériences d'immunobuvardage ou de RT-PCR. Nous n'avons pu procéder aux expériences nécessaires afin d'expliquer cette observation. Bien que nous n'ayons pas observé d'induction de l'ARNm ou de la protéine, il est plausible que le récepteur migre à la surface cellulaire suite à un quelconque stimulus ou qu'il soit lié à des protéines chaperonnes le rendant inactif. Nous ne pouvons rejeter l'hypothèse d'une modification post-transcriptionnelle suite à l'ischémie ou l'association d'une seconde protéine avec la partie N-terminale du récepteur CB1 faisant ainsi obstacle à la reconnaissance du récepteur par l'anticorps. Le récepteur CB1, à l'instar de plusieurs récepteurs de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), forme des

homodimères et des hétérodimères(134). Plusieurs RCPG nécessitent même une dimérisation afin de migrer à la surface cellulaire(135). Les domaines de dimérisation sont encore inconnus, mais on ne peut écarter l'hypothèse voulant que l'ischémie reperfusion ait altéré un éventuel dimère révélant du même coup la séquence N-terminale liant l'anticorps utilisé en immunohistochimie. Toutes ces hypothèses démontrent en fait la différence entre l'identification d'une protéine résultant d'une extraction tissulaire et l'identification d'une protéine sur une coupe histologique dans un environnement reproduisant la réalité avec plus de fidélité.

5.c) Cannabinoïdes et cardioprotection

Nous avons choisi de travailler avec le palmitoylethanolamide (PEA) car c'était celui parmi les trois endocannabinoïdes (anandamide, 2-AG, PEA) connus à ce temps qui conférait la meilleure protection cardiaque contre l'ischémie(21). Rappelons que depuis les travaux de l'équipe de Piomelli, le PEA n'est plus considéré comme un endocannabinoïde(62). Les propriétés anti-inflammatoires du PEA seraient dues à l'activation du récepteur PPAR α telles qu'illustrées dans leur modèle murin d'inflammation à la carragénine et confirmé par l'absence d'activité anti-inflammatoire du PEA chez les souris invalidées pour le récepteur PPAR α . La valeur de l'EC₅₀ du PEA pour le récepteur PPAR α a été évaluée à $3,1 \pm 0,4$ μ M(62). Rappelons que la concentration de PEA utilisée dans nos expériences était de 300 nM, soit 10 fois moins que l'EC₅₀ pour le récepteur PPAR α et que nous pouvons croire que les propriétés cardioprotectrices du PEA dans notre modèle puissent être expliquées par d'autres mécanismes que l'activation de ce récepteur nucléaire. Nous avons montré que celle-ci était conférée par l'activation du récepteur CB2 car seulement l'agoniste inverse SR144528 inhibait ladite protection. La multitude de propriétés pharmacologiques, décrites en introduction de la thèse, attribuées au PEA rend difficile l'interprétation des résultats obtenus suite à son utilisation.

Même si les deux agonistes inverse SR141716A et SR144528 ont bloqué l'effet protecteur du préconditionnement ischémique sur la fonction endothéliale(122), ces agonistes inverses ne

sont pas les seuls pouvant inhiber les effets protecteurs du préconditionnement ischémique et ainsi on ne pourrait prétendre objectivement que les cannabinoïdes soient responsables du préconditionnement ischémique. En suivant le même raisonnement, nous devons donc rester prudents dans notre interprétation du rôle du récepteur CB2 dans les effets protecteurs du PEA puisque le PEA joue peut-être un rôle indirect dans l'activation de ces récepteurs.

Il devenait important, par conséquent, de confirmer le rôle des récepteurs cannabinoïdes dans le phénomène de cardioprotection observé. L'étude réalisée avec les agonistes sélectifs pour les récepteurs CB1 (ACEA) et CB2 (JWH015 et JWH133) a permis d'apporter les précisions nécessaires à la compréhension du rôle respectif des deux sous-types de récepteurs. Nous avons choisi de travailler avec l'ACEA (Arachidonyl-2'-chloroéthylamide) à cause de sa grande affinité pour le récepteur CB1 (K_i 1,4 nM) sa sélectivité par rapport au récepteur CB2 (K_i 3,1 μ M) et de sa ressemblance chimique au composé endogène anandamide(136). Dans le modèle *ex vivo*, une concentration minimale de 50 nM a due être utilisée afin d'observer un effet cardioprotecteur, soit 30 fois le K_i de l'ACEA pour le récepteur CB1. Notons que l'ACEA, contrairement à certains composés ayant un méthyl sur le carbone 1 ou 2, reste vulnérable à l'hydrolyse enzymatique de la FAAH(73). Des données récentes suggèrent que l'anandamide se lierait au récepteur TRPV1 vanilloïde de la capsaïcine et que le SR141716A peut inhiber son activité(50;101). Considérant leur structure chimique similaire, on constate forcément que l'ACEA peut aussi se lier au récepteur TRPV1(137). Underdown *et al.* ont démontré que l'anandamide (1

μM), mais pas l'agoniste CB1 (HU-210, 1 μM et ACPA, 1 μM) ou CB2 (JWH133, 1 μM) utilisé, pouvait réduire la taille de l'infarctus(138) dans un modèle *ex vivo* de cœur isolé perfusé à pression constante (80 mm Hg) et soumis à une ischémie totale (débit coronaire de 0 ml/min). Nous n'avions pu démontrer un tel effet protecteur de l'anandamide dans notre modèle à perfusion constante et d'ischémie globale partielle(21). Nous ne pouvons expliquer avec certitude l'origine de cette apparente contradiction. Les différences méthodologiques sont certes importantes puisque la perfusion à débit constant implique une reperfusion à débit constant où l'on observe une élévation importante de la pression de perfusion causée par l'état de contracture du muscle cardiaque due à la surcharge calcique. Dans leur modèle de perfusion à pression constante, les auteurs décrivent un débit coronaire d'environ 15 ml/min avant l'ischémie et 3 ml/min à la reperfusion. Une autre différence d'importance est la perfusion des agonistes pendant toute la durée de la reperfusion. Rappelons que lors de nos expériences portant sur le moment d'administration du JWH133, nous avons observé une diminution de la taille de l'infarctus indifféremment du moment d'administration alors que la récupération fonctionnelle n'était appréciable que si l'agoniste avait été perfusé 15 min avant ou pendant l'ischémie. Nous avons aussi discuté de la sensibilité de l'anandamide à la FAAH qui réduisait sensiblement son temps de demie vie physiologique. Lors d'une ischémie totale, la perfusion du tampon, de même que de l'agoniste est arrêtée, ce qui laisse supposer que l'anandamide est dégradé rapidement et n'est plus présente dans le cœur pendant l'ischémie. Le modèle et les résultats présentés ressemblent plutôt à des protocoles où les agonistes auraient été perfusés uniquement à la

reperfusion. Cependant, aucun effet protecteur du HU-210, de l'ACPA ou du JWH133 n'a pu être révélé. Les concentrations utilisés dans les expériences semblent très élevées, soit 1 μ M pour tous les agonistes, ce qui correspond environ à 16 000X le K_i du HU-210 pour le récepteur CB1 et 2000X le K_i pour le récepteur CB2, 450X le K_i de l'ACPA pour le récepteur CB1 et 300X le K_i du JWH133 pour le récepteur CB2. Dans notre courbe d'efficacité, nous avons trouvé qu'il était nécessaire d'utiliser 30X le K_i de l'ACEA pour le récepteur CB1 et 3X le K_i du JWH015 pour le récepteur CB2. Attendu que l'hypothèse de Bouaboula sur l'inactivation des récepteurs cannabinoïdes via une phosphorylation induite par un agoniste(89) s'avérerait vraie, on peut proposer que la perfusion d'un agoniste à très haute dose avant une ischémie totale pourrait inactiver les récepteurs cannabinoïdes et prévenir l'effet protecteur de ceux-ci.

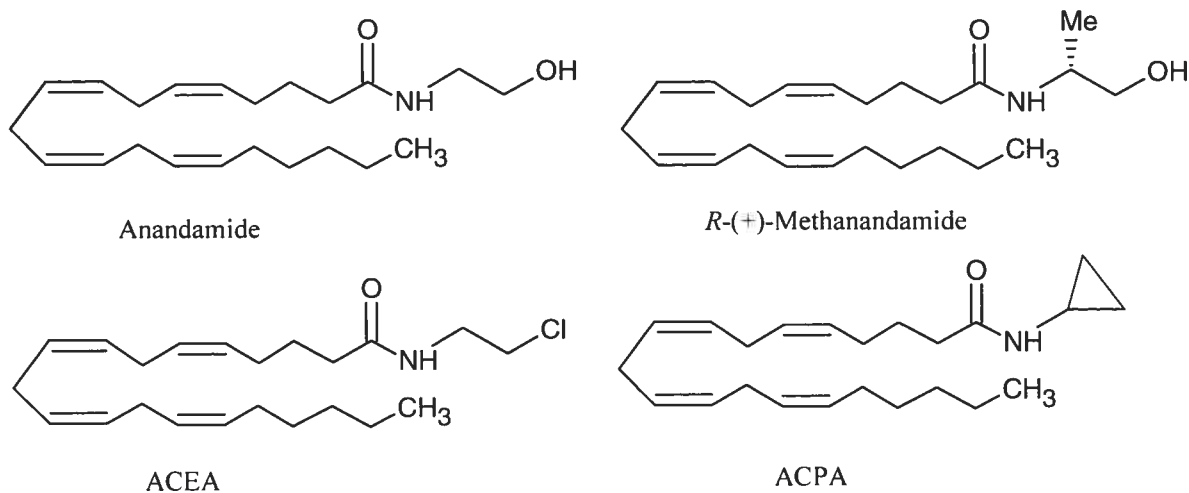


Figure 32 Formule chimique développée de l'anandamide, de la *R*-(+)-Méthanandamide, de l'ACEA et de l'ACPA.

L'agoniste JWH133 (K_i 3,4 nM) a remplacé le JWH015 (K_i 13,8 nM) lorsque celui-ci a été disponible car il possède une plus grande affinité pour le récepteur CB2(139;140). Le JWH133 a une structure similaire au Δ^9 -THC et il est actif *in vivo*(141).

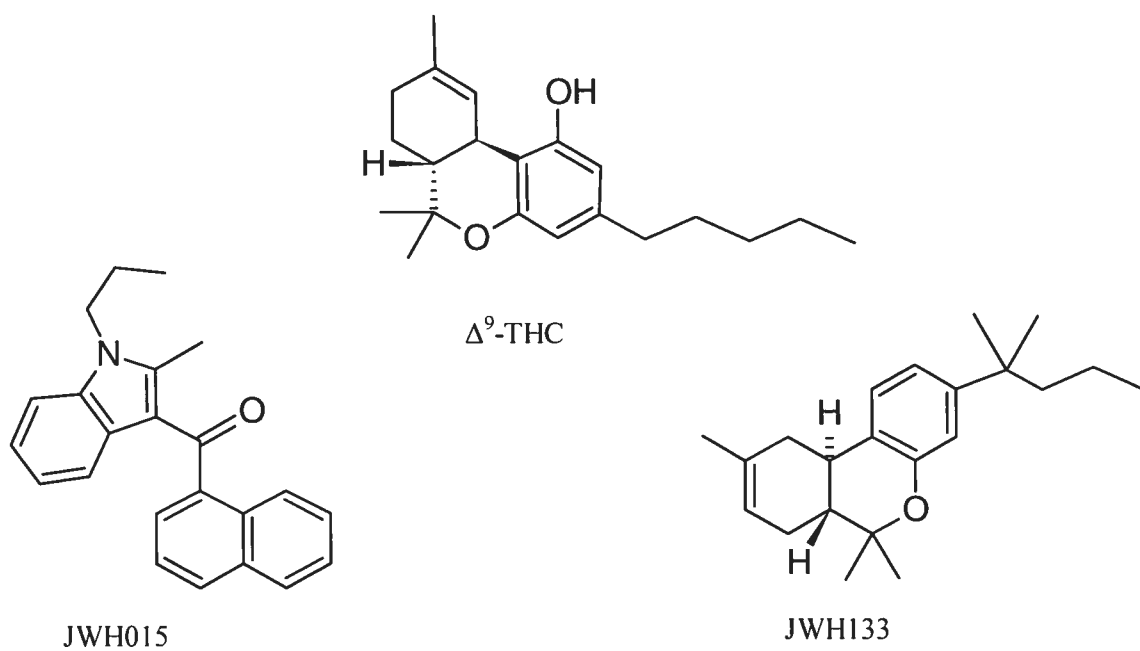


Figure 33 Formule chimique développée du Δ^9 -THC, du JWH015 et du JWH133.

Ford *et al*, ont décrit un faible effet vasodilatateur dans un modèle de coeur isolé suite à un bolus d'ACEA (5 nM) ou d'anandamide (3 μ M) alors que le JWH015 est resté sans effet(142). Nous n'avons pas observé d'effet sur la pression de perfusion coronaire suite à l'administration d'ACEA ou de JWH133. Notons cependant que notre protocole (perfusion lente d'un agoniste débutant 5 minutes avant l'ischémie) ne permettait pas d'apprécier un tel effet considérant le court délai entre le début de la perfusion et le début de la période d'ischémie.

Les agonistes inverses pour le récepteur CB1, SR141716A (K_i 2 nM vs $K_i > 1 \mu$ M pour le CB2)(143) et le récepteur CB2, SR144528 (K_i 0,3 nM vs K_i 437 nM pour le récepteur CB1)(144) présentent aussi d'excellentes sélectivités pour leurs récepteurs respectifs. La concentration de 1 μ M utilisée dans la première étude a pu sembler légèrement élevée, particulièrement pour le SR144528 puisqu'elle correspondait à 2 fois le K_i pour le récepteur CB1. Nous avons travaillé, par la suite, avec des concentrations de 100 nM qui se sont avérées efficaces tout en évitant ce problème.

5.d) Variation de la pression artérielle dans le modèle *in vivo*

Nous avons observé une baisse significative de la pression artérielle chez les animaux traités avec le CP55940. Les propriétés vasodilatatrices des cannabinoïdes sont connues et ont fait l'objet d'une étude dans un modèle de rat similaire au nôtre(145). Dans leur étude, Schmid *et al.* ont établi une courbe dose-réponse pour les molécules WIN 55-212-2 et CP 55940 et ont observé une baisse de pression artérielle soutenue significative avec une dose de 30 µg/kg de CP55940. Ils ont aussi observé une baisse de la fréquence cardiaque, de la fréquence respiratoire ainsi que des taux circulants de noradrénaline. Le WIN 55-212-2 a pour sa part causé des baisses de pression transitoires et de moindre importance aux doses équivalentes.

Les baisses transitoires de pressions observées suite à l'administration intra-péritonéale des deux agonistes inverses ne sont pas causées par ceux-ci mais bien par le véhicule. Celui-ci est constitué d'une solution hydroalcoolique d'un titre de 10% alcool (éthanol) par volume. L'éthanol peut causer une vasodilatation et pourrait donc expliquer la baisse transitoire de pression observée. De plus, la température de la solution injectée était inférieure à la température corporelle de l'animal et on peut supposer qu'une vasodilatation mésentérique, causant une augmentation du débit sanguin mésentérique, ait pu être nécessaire afin de rétablir la température de la cavité abdominale.

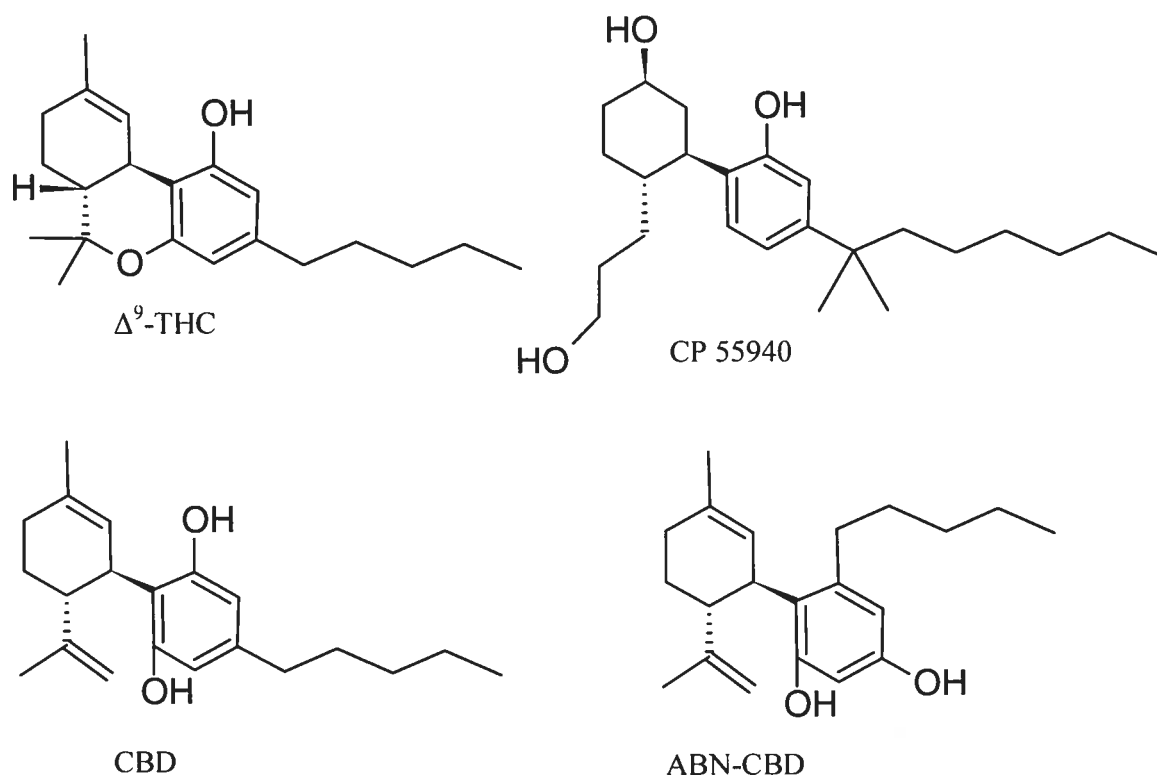


Figure 34 Formule chimique développée du Δ^9 -THC, du CP55940, du cannabidiol (CBD) et du ABN-CBD

Le récepteur CB1 est souvent associé à des baisses de pression artérielle puisque généralement, l'agoniste inverse SR141716A inhibe l'effet des cannabinoïdes sur la pression artérielle(94;146). Cependant, cette baisse de pression a été observée chez des souris CB1^{-/-} suite à l'administration d'ABN-CDB et une vasodilatation mésentérique sensible au SR141716A a été observée suite à l'administration d'anandamide sur ces mêmes souris(105). De nouvelles données au sujet de la controverse entourant l'origine de cette vasodilatation de même que son mécanisme d'action nous permettent de supposer l'existence de récepteurs cannabinoïdes différents de ceux déjà connus. Dans une revue récente, Begg *et al.* résume les travaux décrivant les effets vasodilatateurs des cannabinoïdes(147). Un récepteur orphelin (GPR55) liant le CP55940 a été proposé comme étant le récepteur endothélial manquant(148). Plusieurs auteurs ont rapporté que le SR141716A pouvait bloquer les effets vasodilatateurs des cannabinoïdes à des concentrations légèrement supérieures aux concentrations attendues (1-3 μ M ou 3 mg/kg) alors que l'AM251 (1 μ M ou 3 mg/kg) était resté sans effet bien qu'il partage sensiblement les mêmes valeurs de K_i pour le récepteur CB1(113;149-151).

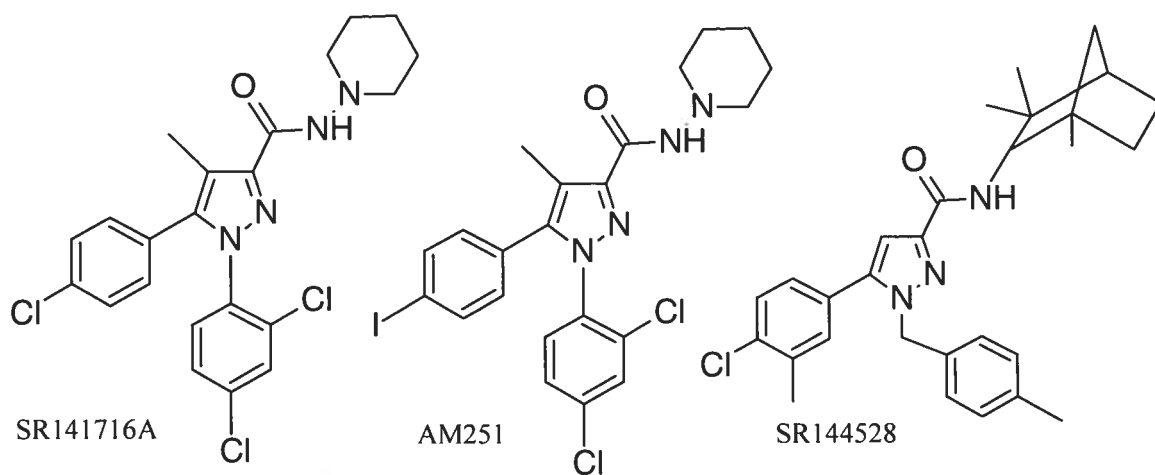


Figure 35. Formule chimique développée du SR141716A, de l'AM251 et du SR144528

C'est suite à ces critiques sur le manque de sélectivité du SR141716A (rimonabant) qu'on lui a préféré l'AM251 pour notre étude *in vivo*. Nous avons décrit, en accord avec les données recueillies dans la littérature, une baisse importante de pression artérielle dans le groupe traité avec le CP55940. L'AM251 a inhibé partiellement cette baisse de pression sans atteindre le seuil significatif alors que le SR144528 est resté sans effet. Nous avons identifié le récepteur CB1 sur les cellules endothéliales des capillaires et des artéioles ventriculaires. Considérant l'absence de réactivité croisée de l'anticorps anti-CB1 choisi avec le GPR55 due à un manque flagrant d'analogie au niveau de la séquence protéique des deux récepteurs, particulièrement sur l'extrémité N-terminale ciblée par l'anticorps, nous ne pouvons remettre en cause, à la lumière de nos résultats, la présence des récepteurs CB1 sur les cellules endothéliales cardiaques. Cependant, bien que les nouvelles données décrites ultérieurement sèment un doute raisonnable sur le rôle de ce récepteur dans l'effet hypotenseur des cannabinoïdes, nous ne croyons pas pouvoir d'ores et déjà exclure l'implication possible des récepteurs CB1 dans l'effet hypotenseur du CP55940. Il a été décrit récemment, et on ne saurait en être étonné considérant la similarité des structures chimiques entre les deux agonistes inverses, que l'AM251 pourrait aussi se lier au récepteur GPR55(148). Le CP55940 lierait aussi le GPR55 alors que le WIN 55-212-2 ne s'y lierait pas. Cependant, les références décrites par Baker dans l'article cité(148) sont contradictoires quant à l'essence de l'activité agoniste ou agoniste inverse du CP55940 sur le GPR55. Finalement, il est aussi d'importance de remarquer que le WIN 55-212-2, un agoniste non sélectif pour les récepteurs CB1 et CB2, avait causé une faible hypotension transitoire dans l'étude de Szabo(145) et qu'il n'a pas présenté de propriétés

hypotensives dans les travaux décrits par Pfitzer(152) et Di Filippo(120) alors que celle-ci a tout de même observé un effet cardioprotecteur sur la taille d'infarctus associé au récepteur CB2. Il apparaît, à la lumière de ces études, que des travaux supplémentaires, forts des dernières découvertes, seront nécessaires afin de clarifier l'origine de l'hypotension observée.

5.e) Produit FC×PA dans le modèle *in vivo*

Le produit de la fréquence cardiaque par la pression artérielle ($FC \times PA$), pendant une période temps donnée, est un bon indice du travail effectué par le muscle cardiaque. Il est par conséquent un bon outil pour comparer la charge de travail effectuée par le cœur pendant une période d'ischémie afin de s'assurer que celle-ci ne constitue pas un biais à l'analyse du dommage cardiaque tel qu'évalué par la taille de l'infarctus mesurée en fonction de la zone à risque. Considérant l'absence de variation de la fréquence cardiaque entre les groupes étudiés, la baisse du produit $FC \times PA$ du groupe traité avec le CP55940 est due à la baisse de pression artérielle décrite précédemment. Cette baisse du produit $FC \times PA$ n'est cependant pas statistiquement différente en comparaison au groupe non traité et aux autres groupes. Particulièrement, les groupes préalablement traités avec les agonistes inverses AM251 ou SR144528 puis avec le CP55940, présentent eux aussi des baisses de pression artérielle et en conséquence des baisses du produit $FC \times PA$ comparables au groupe CP55940. Le produit $FC \times PA$ ne constitue donc pas un biais et ne peut être tenu responsable de l'effet cardioprotecteur du CP55940 ainsi que de l'inhibition de cet effet par le SR144528 tel que décrit dans les résultats.

5.f) Arythmies

Les arythmies sont un phénomène fréquent et connu dans le cadre d'expériences sur l'ischémie cardiaque. Leur origine ainsi qu'une brève explication de leurs mécanismes dans le contexte de l'ischémie reperfusion ont été revues précédemment. Nous tenons cependant à discuter de l'impact du modèle *ex vivo* ou *in vivo* dans ce phénomène. L'ischémie est la cause sous-jacente à l'apparition d'arythmies cardiaques dans ce modèle. Elle cause un ralentissement de la vitesse de propagation de l'onde de dépolarisation et un potentiel de repos moins élevé que chez les cellules normales. La différence de potentiel membranaire de repos entre les cellules subissant l'ischémie et celles perfusées normalement dans le protocole *in vivo* peut causer une dépolarisation précoce à la frontière de la zone ischémique pouvant engendrer des arythmies. Le ralentissement de la propagation du courant de dépolarisation dans la zone ischémique, peut aussi causer des arythmies en dépolarisant des cellules dans la zone saine après leur période réfractaire. La baisse de pression artérielle observée pendant un épisode ischémique est accompagnée dans le modèle *in vivo* d'une activation réflexe du tonus sympathique qui accentue la demande énergétique du cœur et par conséquent, le dommage ischémique. Elle est aussi par elle-même un facteur proarythmique. La baisse du tonus sympathique telle qu'illustrée par une diminution des taux circulants de noradrénaline causée par le CP55940 ou le WIN 55-212-2 dans les travaux de Niederhoffer(153) et de Schmid(145) pourrait expliquer partiellement la diminution non significative des arythmies que nous avons observée dans le groupe traité avec le CP55940.

5.g) Voies de signalisation

Nous avons discuté du rôle des MAPK dans l'ischémie-reperfusion et la pharmacologie des cannabinoïdes en introduction du présent manuscrit. Les MAPK sont en fait une famille de kinases agissant en cascade les unes sur les autres à divers niveaux, soit les MAP kinases kinases agissant sur les MAP kinases kinases, elles-mêmes phosphorylant les MAP kinases, dont nous avons discutées. La complexité de leurs interrelations s'en retrouve bien entendu multipliée. De plus, leur implication dans les phénomènes cellulaires est presque ubiquitaire. Un bref coup d'œil à la littérature publiée suffit à nous convaincre de l'importance et de la complexité de cette voie de signalisation. En paraphrasant le deuxième verset des Ecclesiastes, nous pourrions presque oser affirmer : « MAPkinas MAPkinatum et omnia MAPkinas ». Chacune des familles de kinases qui composent les MAPK voit le nombre de leurs isoformes s'accroître de façon presque continu. Les conclusions que nous proposons dans la présente, de même que celles publiées dans autant d'articles scientifiques, doivent par conséquent être analysées avec prudence et tenir compte de l'état des connaissances au moment de parution.

Trois techniques ont été utilisées afin d'identifier et d'évaluer la contribution des voies de signalisation à l'effet cardioprotecteur des cannabinoïdes. Des inhibiteurs pharmacologiques, l'identification de la forme phosphorylée de certaines kinases et l'évaluation de l'activité enzymatique de la p38 et la p44/42 MAPK à des moments précis ont permis d'éclaircir le

mécanisme d'action des cannabinoïdes. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques est une technique facile, rapide et peu coûteuse qui permet d'évaluer les conséquences de l'inhibition de certaines voies de signalisation à différents moments du protocole et pendant des durées variables. Nous avons utilisé la chélérythrine, un inhibiteur non sélectif envers les diverses isoformes de la PKC, le PD98059, un inhibiteur de la p44/42 MAPK et le SB203580, un inhibiteur de la p38 MAPK. Le principal inconvénient à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques est que le temps pendant lequel ils sont considérés sélectif T_{sel} est inversement proportionnel à la concentration utilisée C_{inh} , au temps depuis lequel ledit inhibiteur est sur le marché $t_{marché}$ et au nombre d'inhibiteurs de la même cible pharmacologique disponible n_{mh} . Le nombre d'équipes de recherche E_{rech} l'utilisant agit souvent comme catalyseur de la diminution de sa durée de vie utile en favorisant la découverte de nouvelles cibles pharmacologiques affectées par celui-ci. Le facteur k est l'imprécision implicite dans la description des cibles pharmacologiques et une certaine retenue quant à la sélectivité absolue de la substance pourra jouer un rôle favorable sur la durée d'utilisation de l'inhibiteur.

$$T_{sel} = \frac{k}{E_{rech}} \cdot \frac{1}{(C_{inh} \cdot t_{marché} \cdot n_{mh})}$$

L'équipe de Cohen a confirmé la spécificité de l'inhibiteur de la p38 MAPK (SB203580) à une concentration de 10 μ M, soit deux fois la concentration utilisée dans notre modèle, dans un modèle cellulaire d'essai kinase(154). Ils ont montré que le SB203580 inhibait sélectivement la SAPK2a/p38 MAPK et la SAPK2b/p38 β 2 MAPK, avec des valeurs d'IC₅₀

respectives de 50 nM et de 500 nM. Une lymphocyte kinase (LCK), la protéine kinase B α (PKB α), la glycogène synthétase kinase 3 β (GSK3 β) ont aussi été partiellement inhibées, présentant des valeurs d'IC₅₀ de 100 à 500 fois plus élevées que celle observée pour la p38MAPK. Dans la même étude le PD98059 n'a inhibé aucune des MAPK étudiées. En effet, le mécanisme d'action du PD98059, l'inhibition de l'activation de la MKK1, ne permet pas d'apprécier l'inhibition de l'activité kinase de ERK1/2 dans un tel essai. Les auteurs rappellent clairement ce point et ajoute que le PD98059 inhibe également l'activation de MKK5, conduisant par le fait même à une inhibition de la voie ERK5, et ce aux mêmes concentrations étudiées(154). Il a récemment été rapporté que le PD98059 pouvait aussi activer l'AMPK avec une EC₅₀ de 35 μ M(155), 7 fois la concentration utilisée dans nos expérience. Il a aussi été rapporté que tant le SB203580 que le PD98059 pouvaient inhiber les cyclooxygénases 1 et 2, diminuant de fait les concentrations de prostaglandines et de leukotriènes(156). Rappelons que Bouchard *et al.* ont déjà démontré la contribution de la prostaglandine E2 dans l'effet protecteur de l'IPC sur la fonction endothéliale, dans notre laboratoire(157).

Nous avons déjà discuté des limites qu'entraîne l'utilisation d'anticorps dirigés envers une protéine spécifique, nommant la p38 MAPK, lorsque celle-ci est ultérieurement décrite comme un ensemble de protéines distinctes.

En terminant, nous sommes conscient que nous n'avons pas exploré exhaustivement les diverses voies de signalisation intracellulaires, faute de temps et de moyens. Nous avons

sélectionné certaines des voies de signalisation impliquées dans les phénomènes d'ischémie-reperfusion, de preconditionnement ischémique et dans la pharmacologie des récepteurs aux cannabinoïdes. Plusieurs autres voies de signalisation pourraient à leur tour être explorées, soit la voie de la PI3K et les voies de l'apoptose. De même, une étude plus approfondie de la famille des PPARs, plus particulièrement le PPAR α serait d'intérêt, compte tenu du rôle de ce récepteur dans l'inflammation et de son affinité pour la molécule PEA.

5.h) Monoxyde d'azote

Le rôle du monoxyde d'azote dans l'effet protecteur des cannabinoïdes devient intéressant lorsque l'on s'attarde à la sélectivité des composés impliqués. Ainsi, l'ACEA, un agoniste CB1 avec une structure semblable à celle de l'anandamide, et partageant les mêmes affinités pour le récepteur CB1 et TRPV1(137), a induit une légère expression de la protéine iNOS. L'anandamide a déjà été associée à la production de NO via les récepteurs TRPV1(50). Nous croyons que l'induction que nous avons rapportée, bien que plus faible que celle rapportée par Wang *et al.* dans leur modèle murin d'IPC(44), était suffisante pour produire un effet cardioprotecteur. Cela semble avoir été confirmé par l'effet délétère de l'administration de NNLA sur le traitement avec l'ACEA, effet qui n'a pas été rapporté avec l'agoniste CB2 (JWH015). L'administration du NNLA a aussi inhibé l'effet protecteur du PEA et non celui du 2-AG, qui semble être plus spécifique pour le récepteur CB2(54). Nous avons déjà discuté des diverses propriétés pharmacologiques du PEA, mais rappelons seulement qu'il est généralement accepté que le PEA agit, entre autres, en inhibant la FAAH, ce qui augmente le temps de demi-vie des endocannabinoïdes sujets à son action enzymatique, comme l'anandamide. Wang *et al.* ont démontré qu'une faible induction de iNOS était associée avec un stimulus protecteur et un pronostic favorable alors qu'une forte induction de iNOS, principalement dans les cellules inflammatoires, était associée avec un stimulus pro inflammatoire délétère et un pronostic défavorable(44). Considérant la localisation endothéliale des récepteurs CB1 rapportée dans nos travaux, nous devrions considérer

l'implication de l'isoforme endothéliale constitutive eNOS dans l'effet protecteur, de même que l'isoforme iNOS, préalablement citée. L'isoforme bNOS, présente dans les cellules musculaire lisse(158), ne semble pas impliquée puisque nous n'avons pas localisé de récepteurs CB1 dans ce type cellulaire. Dans leurs travaux, Lagneux *et al.* décrivent un effet inhibiteur de l'agoniste inverse CB2 (SR144528) et non de l'agoniste inverse CB1 (SR141716A) sur la protection induite par un traitement avec le SNP, un donneur de NO. L'absence d'inhibition par le SR144528 de l'effet protecteur de l'ACEA indique que le récepteur CB2 n'est pas responsable de la protection conférée par la stimulation du récepteur CB1 et de la production de NO. Nous croyons que le NO, généré suite à une stimulation des récepteurs CB1, joue un rôle bénéfique dans l'effet protecteur des endocanninoïdes ou des agonistes CB1 administrés de façon exogène, mais qu'il n'est pas impliqué dans l'effet protecteur des agonistes CB2, et qu'il ne peut expliquer, à lui seul, l'effet protecteur des agonistes CB1.

Nous avons discuté de l'effet potentiellement délétère du NO dans certaines conditions et il est intéressant de noter que l'inhibition de la synthèse de NO par le NNLA a contribué à mettre en évidence l'effet protecteur de l'agoniste CB1 (ACEA) sur la récupération fonctionnelle dans le modèle *ex vivo* d'ischémie cardiaque moins sévère (0,6 ml/min) alors que celui-ci n'avait pu favoriser cette récupération sous les autres conditions expérimentales étudiées. Ces dernières données sont peut-être un autre exemple de l'effet ambivalent du NO dans différentes conditions expérimentales dépendamment de la quantité de NO produit et de son origine.

5.i) HSP27/70

Plusieurs indices pointaient dans la direction des protéines de choc thermique comme d'éventuels effecteurs des propriétés cardioprotectrices des cannabinoïdes. La cardioprotection conférée par un choc thermique est inhibée par un traitement avec un agoniste inverse CB2(119). La HSP27 est un substrat de la MAPKAP-2, elle-même un substrat de la p38 MAPK, qui est impliquée dans le phénomène de cardioprotection via le récepteur CB2. De plus, un lien entre la HSP27, AKT et l'apoptose des neutrophiles, qui peuvent potentialiser le dommage cardiaque à la reperfusion, a été démontré(159). La HSP70, qui est inductible, a aussi été associée aux phénomènes cardioprotecteurs contre l'ischémie et la reperfusion(160;161). Nous n'avons pu démontrer clairement une implication de l'une ou l'autre de ces chaperones dans l'effet cardioprotecteur des cannabinoïdes pour les temps de prélèvement étudiés. L'induction de la HSP70 par l'agoniste CB2 lors de la perfusion ne semble pas convaincante puisqu'elle n'est pas maintenue tout au cours du protocole. Aucune phosphorylation de l'une ou l'autre des protéines n'a été confirmée. Nos résultats ne nous permettent pas d'exclure les HSP27/70 comme d'éventuels effecteurs, mais ces données, quoique préliminaires, se sont avérées négatives.

5.j) Discussion sur le rimonabant (SR141716A) et sur son potentiel thérapeutique.

Le rimonabant fait l'objet d'études cliniques en vue de sa commercialisation par la compagnie Sanofi-Aventis. Celle-ci prétend que l'Acomplia (rimonabant) permettrait de réduire l'obésité en stimulant la sécrétion d'adiponectine par les adipocytes. L'usage du rimonabant pourrait aider à réduire le tabagisme et augmenter le HDL-cholestérol et diminuer les triglycérides. L'inhibition de la sécrétion de $\text{TNF}\alpha$ et d'IL-6 permettraient aussi selon les dires de la compagnie de réduire les risques cardiovasculaires.

Considérant le tabagisme, l'obésité ainsi que l'hypercholestérolémie comme autant de facteurs de risques cardiovasculaires, et considérant l'effet délétère du rimonabant (SR141716A) sur la cardioprotection induite par les cannabinoïdes (taille d'infarctus et récupération fonctionnelle et fonction endothéliale) et l'IPC (fonction endothéliale), nous conservons quelques réserves quant à l'innocuité de ce produit chez les patients pour les indications visées. De plus, il a été démontré que le SR141716A pouvait augmenter la pression artérielle dans des modèles animaux d'hypertension(114).

6. Conclusion

Nous avons montré le rôle protecteur des cannabinoïdes dans le dommage résultant d'un épisode d'ischémie-reperfusion. Des endocannabinoïdes comme le PEA et le 2-AG, de même que des agonistes synthétiques non sélectifs comme le CP55940 ou sélectifs pour le récepteur CB1 (ACEA) ou CB2 (JWH015 et JWH133) ont tous démontré posséder des propriétés cardioprotectrices.

L'effet protecteur du PEA est inhibé par l'agoniste inverse CB2. Le PEA semble activer la p38 MAPK pendant l'ischémie et ERK1/2 pendant la perfusion et la reperfusion. Le rôle de la p38 MAPK est très important dans l'effet protecteur du PEA, de même que la PKC, et dans une moindre mesure, ERK1/2.

Les récepteurs CB1, situés sur les cellules endothéliales des capillaires et des artérioles dans le ventricule de rat, contribuent à la réduction de la taille de l'infarctus en induisant la synthèse de iNOS, la production de monoxyde d'azote et l'activation de ERK1/2.

Les récepteurs CB2, situés principalement sur les cardiomyocytes, contribuent aussi et possiblement de façon plus efficace, à cette cardioprotection puisque l'agoniste inverse pour le récepteur CB2 a bloqué l'effet protecteur de l'agoniste non sélectif dans le modèle *in vivo* alors que l'agoniste inverse pour le récepteur CB1 est resté sans effet. La stimulation des récepteurs CB2 avec un agoniste sélectif semble induire l'activation de la p38 MAPK.

L'effet hypotenseur de l'agoniste non sélectif observé dans le modèle *in vivo* n'est pas complètement inhibé par l'agoniste inverse CB1 et est indépendant du récepteur CB2. Il pourrait donc être causé par l'implication d'un tier récepteur à être ultérieurement identifié.

Bibliographie

Reference List

- (1) Ovize M, Rochette L, Feuvray D. Ischémie-Reperfusion Myocardique. In: Médecine Sciences, editor. Biologie et Pathologie du Coeur et des Vaisseaux. Paris: Flammarion, 2002: 195-208.
- (2) Katz AM. The Ischemic Heart. In: Weinberg RW, LaPlante M, Lerman E, editors. Physiology of the Heart. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001: 630-657.
- (3) Youker K, Smith CW, Anderson DC, Miller D, Michael LH, Rossen RD et al. Neutrophil adherence to isolated adult cardiac myocytes. Induction by cardiac lymph collected during ischemia and reperfusion. Journal of Clinical Investigation 1992; 89(2):602-609.
- (4) Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH et al. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. Circulation 1998; 98(7):699-710.
- (5) Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, Frangogiannis NG, Smith CW, Michael LH et al. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. Circulation 1999; 99(4):546-551.
- (6) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with Ischemia - A Delay of Lethal Cell Injury in Ischemic Myocardium. Circulation 1986; 74(5):1124-1136.
- (7) Yoshida K, Hirata T, Akita Y, Mizukami Y, Yamaguchi K, Sorimachi Y et al. Translocation of protein kinase C-alpha,delta and epsilon isoforms in ischemic rat heart. Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease 1996; 1317(1):36-44.
- (8) Albert CJ, Ford DA. Protein kinase C translocation and PKC-dependent protein phosphorylation during myocardial ischemia. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 1999; 276(2):H642-H650.

- (9) Fryer RM, Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ. Importance of PKC and tyrosine kinase in single or multiple cycles of preconditioning in rat hearts. *The American journal of physiology* 1999; 276(4 Pt 2):H1229-H1235.
- (10) Ping P, Zhang J, Cao X, Li RC, Kong D, Tang XL et al. PKC-dependent activation of p44/p42 MAPKs during myocardial ischemia- reperfusion in conscious rabbits. *The American journal of physiology* 1999; 276(5 Pt 2):H1468-H1481.
- (11) Saurin AT, Pennington DJ, Raat NJH, Latchman DS, Owen MJ, Marber MS. Targeted disruption of the protein kinase C epsilon gene abolishes the infarct size reduction that follows ischaemic preconditioning of isolated buffer-perfused mouse hearts. *Cardiovascular Research* 2002; 55(3):672-680.
- (12) Armstrong SC. Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 2004; 61(3):427-436.
- (13) Fryer RM, Wang YG, Hsu AK, Gross GJ. Essential activation of PKC-delta in opioid-initiated cardioprotection. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2001; 280(3):H1346-H1353.
- (14) Sugden PH, Clerk A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circulation Research* 1998; 83(4):345-352.
- (15) Omura T, Yoshiyama M, Shimada T, Shimizu N, Kim S, Iwao H et al. Activation of mitogen-activated protein kinases in in vivo ischemia/reperfused myocardium in rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1999; 31(6):1269-1279.
- (16) Fryer RM, Patel HH, Hsu AK, Gross GJ. Stress-activated protein kinase phosphorylation during cardioprotection in the ischemic myocardium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2001; 281(3):H1184-H1192.
- (17) Punu A, Mockridge JW, Farooqui S, Marber MS, Heads RJ. Sustained activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase during recovery from simulated ischaemia mediates adaptive cytoprotection in cardiomyocytes. *Biochemical Journal* 2000; 350:891-899.
- (18) Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2005; 288(2):H971-H976.

- (19) Fryer RM, Pratt PF, Hsu AK, Gross GJ. Differential activation of extracellular signal regulated kinase isoforms in preconditioning and opioid-induced cardioprotection. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2001; 296(2):642-649.
- (20) Haq SE, Clerk A, Sugden PH. Activation of mitogen-activated protein kinases (p38-MAPKs, SAPKs/JNKs and ERKs) by adenosine in the perfused rat heart. *Febs Letters* 1998; 434(3):305-308.
- (21) Lepicier P, Bouchard JF, Lagneux C, Lamontagne D. Endocannabinoids protect the rat isolated heart against ischaemia. *British Journal of Pharmacology* 2003; 139(4):805-815.
- (22) Gorog DA, Tanno M, Cao XB, Bellahcene M, Bassi R, Kabir AMN et al. Inhibition of p38 MAPK activity fails to attenuate contractile dysfunction in a mouse model of low-flow ischemia. *Cardiovascular Research* 2004; 61(1):123-131.
- (23) Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han JH, Ulevitch RJ et al. Pro-Inflammatory Cytokines and Environmental-Stress Cause P38 Mitogen-Activated Protein-Kinase Activation by Dual Phosphorylation on Tyrosine and Threonine. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270(13):7420-7426.
- (24) Weinbrenner C, Liu GS, Cohen MV, Downey JM. Phosphorylation of tyrosine 182 of p38 mitogen-activated protein kinase correlates with the protection of preconditioning in the rabbit heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1997; 29(9):2383-2391.
- (25) Marais E, Genade S, Huisamen B, Strijdom JG, Moolman JA, Lochner A. Activation of p38 MAPK induced by a multi-cycle ischaemic preconditioning protocol is associated with attenuated p38 MAPK activity during sustained ischaemia and reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2001; 33(4):769-778.
- (26) Gysembergh A, Simkhovich BZ, Kloner RA, Przyklenk K. p38 MAPK activity is not increased early during sustained coronary artery occlusion in preconditioned versus control rabbit heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2001; 33(4):681-690.
- (27) Lochner A, Genade S, Hattingh S, Marais E, Huisamen B, Moolman JA. Comparison between ischaemic and anisomycin-induced preconditioning: Role of p38 MAPK. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 2003; 17(3):217-230.

- (28) Mocanu MM, Baxter GF, Yue Y, Critz SD, Yellon DM. The p38 MAPK inhibitor, SB203580, abrogates ischaemic preconditioning in rat heart but timing of administration is critical. *Basic Research in Cardiology* 2000; 95(6):472-478.
- (29) Iliodromitis EK, Gaitanaki C, Lazou A, Bofilis E, Karavolias GK, Beis I et al. Dissociation of stress-activated protein kinase (p38-MAPK and JNKs) phosphorylation from the protective effect of preconditioning in vivo. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2002; 34(8):1019-1028.
- (30) Wang YB, Huang SA, Sah VP, Ross J, Brown JH, Han JH et al. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(4):2161-2168.
- (31) Court NW, dos Remedios CG, Cordell J, Bogoyevitch MA. Cardiac expression and subcellular localization of the p38 mitogen-activated protein kinase member, stress-activated protein kinase-3 (SAPK3). *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2002; 34(4):413-426.
- (32) Liang QR, Molkentin JD. Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: dichotomy between cultured myocytes and animal models. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2003; 35(12):1385-1394.
- (33) Eefting F, Rensing B, Wigman J, Pannekoek WJ, Liu WM, Cramer MJ et al. Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 2004; 61(3):414-426.
- (34) Razavi HM, Hamilton JA, Feng QP. Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure. *Pharmacology & Therapeutics* 2005; 106(2):147-162.
- (35) Song W, Lu XR, Feng QP. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis via inducible nitric oxide synthase in neonatal mouse cardiomyocytes. *Cardiovascular Research* 2000; 45(3):595-602.
- (36) Brookes PS, Salinas EP, Darley-USmar K, Eiserich JP, Freeman BA, Darley-USmar VM et al. Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(27):20474-20479.
- (37) Liu PT, Hock CE, Nagele R, Wong PYK. Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1997; 41(5):H2327-H2336.

- (38) Rossig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM, Mulsch A et al. Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(11):6823-6826.
- (39) Tabuchi A, Sano K, Oh E, Tsuchiya T, Tsuda M. Modulation of Ap-1 Activity by Nitric-Oxide (No) In-Vitro - No-Mediated Modulation of Ap-1. *Febs Letters* 1994; 351(1):123-127.
- (40) Schulz R, Kelm M, Heusch G. Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 2004; 61(3):402-413.
- (41) Liang F, Gao E, Tao L, Liu HR, Qu Y, Christopher TA et al. Critical timing of L-arginine treatment in post-ischemic myocardial apoptosis - role of NOS isoforms. *Cardiovascular Research* 2004; 62(3):568-577.
- (42) Guo Y, Jones WK, Xuan YT, Tang XL, Bao W, Wu WJ et al. The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96(20):11507-11512.
- (43) Lochner A, Marais E, Du Toit E, Moolman J. Nitric oxide triggers - Classic ischemic preconditioning. *Nitric Oxide: Novel Actions, Deleterious Effects and Clinical Potential* 2002; 962:402-414.
- (44) Wang Y, Guo YR, Zhang SX, Wu WJ, Wang JX, Bao WK et al. Ischemic preconditioning upregulates inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2002; 34(1):5-15.
- (45) Molina-Holgado F, Molina-Holgado E, Guaza C, Rothwell NJ. Role of CB1 and CB2 receptors in the inhibitory effects of cannabinoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release in astrocyte cultures. *Journal of Neuroscience Research* 2002; 67(6):829-836.
- (46) Esposito G, Izzo AA, Di Rosa M, Iuvone T. Selective cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of inducible nitric oxide synthase protein expression in C6 rat glioma cells. *Journal of Neurochemistry* 2001; 78(4):835-841.
- (47) Ross RA, Brockie HC, Pertwee RG. Inhibition of nitric oxide production in RAW264.7 macrophages by cannabinoids and palmitoylethanolamide. *European Journal of Pharmacology* 2000; 401(2):121-130.

- (48) Stefano GB, Liu Y, Goligorsky MS. Cannabinoid receptors are coupled to nitric oxide release in invertebrate immunocytes, microglia, and human monocytes. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271(32):19238-19242.
- (49) Stefano GB, Esch T, Cadet P, Zhu W, Mantione K, Benson H. Endocannabinoids as autoregulatory signaling molecules: coupling to nitric oxide and a possible association with the relaxation response. *Medical science monitor* 2003; 9(4):RA63-RA75.
- (50) Poblete LM, Orliac ML, Briones R, Adler-Graschinsky E, Huidobro-Toro JP. Anandamide elicits an acute release of nitric oxide through endothelial TRPV1 receptor activation in the rat arterial mesenteric bed. *Journal of Physiology-London* 2005; 568(2):539-551.
- (51) Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G et al. Isolation and Structure of A Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. *Science* 1992; 258(5090):1946-1949.
- (52) Mechoulam R, Benshabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR et al. Identification of An Endogenous 2-Monoglyceride, Present in Canine Gut, That Binds to Cannabinoid Receptors. *Biochemical Pharmacology* 1995; 50(1):83-90.
- (53) DiMarzo V, DePetrocellis L, Sugiura T, Waku K. Potential biosynthetic connections between the two cannabimimetic eicosanoids, anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol, in mouse neuroblastoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996; 227(1):281-288.
- (54) Gonsiorek W, Lunn C, Fan XD, Narula S, Lundell D, Hipkin RW. Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: Antagonism by anandamide. *Molecular Pharmacology* 2000; 57(5):1045-1050.
- (55) Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE et al. 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98(7):3662-3665.
- (56) Leggett JD, Aspley S, Beckett SRG, D'Antona AM, Kendall DA, Kendall DA. Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors. *British Journal of Pharmacology* 2004; 141(2):253-262.

- (57) Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiological Reviews* 2003; 83(3):1017-1066.
- (58) Felder CC, Glass M. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1998; 38:179-200.
- (59) Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O et al. Comparison of the Pharmacology and Signal-Transduction of the Human Cannabinoid Cb1 and Cb2 Receptors. *Molecular Pharmacology* 1995; 48(3):443-450.
- (60) Griffin G, Tao Q, Abood ME. Cloning and pharmacological characterization of the rat CB(2) cannabinoid receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2000; 292(3):886-894.
- (61) Lambert DM, Di Marzo V. The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas: Are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Current Medicinal Chemistry* 1999; 6(8):757-773.
- (62) Lo Verme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A et al. The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- α mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Molecular Pharmacology* 2005; 67(1):15-19.
- (63) Di M, V, Melck D, Orlando P, Bisogno T, Zagoory O, Bifulco M et al. Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells. *Biochemical Journal* 2001; 358(Pt 1):249-255.
- (64) Fowler CJ, Jonsson KO, Tiger G. Fatty acid amide hydrolase: biochemistry, pharmacology, and therapeutic possibilities for an enzyme hydrolyzing anandamide, 2-arachidonoylglycerol, palmitoylethanolamide, and oleamide. *Biochemical Pharmacology* 2001; 62(5):517-526.
- (65) Jonsson KO, Vandevoorde S, Lambert DM, Tiger G, Fowler CJ. Effects of homologues and analogues of palmitoylethanolamide upon the inactivation of the endocannabinoid anandamide. *British Journal of Pharmacology* 2001; 133(8):1263-1275.
- (66) Di Marzo V. Biosynthesis and inactivation of endocannabinoids: Relevance to their proposed role as neuromodulators. *Life Sci* 1999; 65(6-7):645-655.

- (67) Di M, V, Bisogno T, De Petrocellis L, Melck D, Martin BR. Cannabimimetic fatty acid derivatives: the anandamide family and other endocannabinoids. *Current Medicinal Chemistry* 1999; 6(8):721-744.
- (68) Piomelli D, Beltramo M, Glasnapp S, Lin SY, Goutopoulos A, Xie XQ et al. Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96(10):5802-5807.
- (69) Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 1997; 277(5329):1094-1097.
- (70) Zygmunt PM, Chuang HH, Movahed P, Julius D, Hogestatt ED. The anandamide transport inhibitor AM404 activates vanilloid receptors. *European Journal of Pharmacology* 2000; 396(1):39-42.
- (71) Deutsch DG, Chin SA. Enzymatic-Synthesis and Degradation of Anandamide, A Cannabinoid Receptor Agonist. *Biochemical Pharmacology* 1993; 46(5):791-796.
- (72) Maccarrone M, van der Stelt M, Rossi A, Veldink GA, Vliegthart JFG, Agrio AF. Anandamide hydrolysis by human cells in culture and brain. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(48):32332-32339.
- (73) Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Current Medicinal Chemistry* 1999; 6(8):635-664.
- (74) Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V. The endocannabinoid signalling system: Biochemical aspects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2005; 81(2):224-238.
- (75) Ueda N, Yamanaka K, Yamamoto S. Purification and characterization of an acid amidase selective for N-palmitoylethanolamine, a putative endogenous anti-inflammatory substance. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(38):35552-35557.
- (76) Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and Characterization of A Cannabinoid Receptor in Rat-Brain. *Molecular Pharmacology* 1988; 34(5):605-613.
- (77) Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of A Cannabinoid Receptor and Functional Expression of the Cloned Cdna. *Nature* 1990; 346(6284):561-564.

- (78) Munro S, Thomas KL, Abushaar M. Molecular Characterization of A Peripheral Receptor for Cannabinoids. *Nature* 1993; 365(6441):61-65.
- (79) Lake KD, Compton DR, Varga K, Martin BR, Kunos G. Cannabinoid-induced hypotension and bradycardia in rats is mediated by CB1-like cannabinoid receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997; 281(3):1030-1037.
- (80) Lake KD, Martin BR, Kunos G, Varga K. Cardiovascular effects of anandamide in anesthetized and conscious normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 1997; 29(5):1204-1210.
- (81) White R, Hiley CR. The actions of some cannabinoid receptor ligands in the rat isolated mesenteric artery. *British Journal of Pharmacology* 1998; 125(3):533-541.
- (82) Howlett AC, Qualy JM, Khachatrian LL. Involvement of Gi in the Inhibition of Adenylate-Cyclase by Cannabimimetic Drugs. *Molecular Pharmacology* 1986; 29(3):307-313.
- (83) Rhee MH, Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Vogel Z. Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *Journal of Neurochemistry* 1998; 71(4):1525-1534.
- (84) Sterin-Borda L, Del Zar CF, Borda E. Differential CB1 and CB2 cannabinoid receptor-inotropic response of rat isolated atria: Endogenous signal transduction pathways. *Biochemical Pharmacology* 2005; 69(12):1705-1713.
- (85) Bouaboula M, Desnoyer N, Carayon P, Combes T, Casellas P. G(i) protein modulation induced by a selective inverse agonist for the peripheral cannabinoid receptor CB2: Implication for intracellular signalization cross-regulation. *Molecular Pharmacology* 1999; 55(3):473-480.
- (86) Bouaboula M, Perrachon S, Milligan L, Canat X, Rinaldi-Carmona M, Portier M et al. A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272(35):22330-22339.
- (87) Deadwyler SA, Hampson RE, Mu J, Whyte A, Childers S. Cannabinoids Modulate Voltage-Sensitive Potassium A-Current in Hippocampal-Neurons Via A Camp-Dependent Process. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1995; 273(2):734-743.

- (88) Bouaboula M, Bianchini L, McKenzie FR, Pouyssegur J, Casellas P. Cannabinoid receptor CB1 activates the Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 isoform via G(i)-mediated mitogen activated protein kinase signaling transduction pathways. *Febs Letters* 1999; 449(1):61-65.
- (89) Bouaboula M, Dussosoy D, Casellas P. Regulation of peripheral cannabinoid receptor CB2 phosphorylation by the inverse agonist SR 144528 - Implications for receptor biological responses. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(29):20397-20405.
- (90) Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M et al. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochemical Journal* 1995; 312 (Pt 2):637-641.
- (91) Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M et al. Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *European Journal of Biochemistry* 1996; 237(3):704-711.
- (92) Galve-Roperh I, Rueda D, del Pulgar TG, Velasco G, Guzman M. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB1 cannabinoid receptor. *Molecular Pharmacology* 2002; 62(6):1385-1392.
- (93) Zhao Q, He ZW, Chen NY, Cho YY, Zhu F, Lu CR et al. 2-arachidonoylglycerol stimulates activator protein-1-dependent transcriptional activity and enhances epidermal growth factor-induced cell transformation in JB6 P+ cells. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(29):26735-26742.
- (94) Liu J, Gao B, Mirshahi F, Sanyal AJ, Khanolkar AD, Makriyannis A et al. Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochemical Journal* 2000; 346:835-840.
- (95) Derkinderen P, Ledent C, Parmentier M, Girault JA. Cannabinoids activate p38 mitogen-activated protein kinases through CB1 receptors in hippocampus. *Journal of Neurochemistry* 2001; 77(3):957-960.
- (96) Herrera B, Carracedo A, Diez-Zaera M, Guzman M, Velasco G. P38 MAPK is involved in CB2 receptor-induced apoptosis of human leukaemia cells. *Febs Letters* 2005; 579(22):5084-5088.

- (97) Carrier EJ, Kearn CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang WQ, Nithipatikom K et al. Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Molecular Pharmacology* 2004; 65(4):999-1007.
- (98) Correa F, Mestre L, Docagne F, Guaza C. Activation of cannabinoid CB2 receptor negatively regulates IL-12p40 production in murine macrophages: role of IL-10 and ERK1/2 kinase signaling. *British Journal of Pharmacology* 2005; 145(4):441-448.
- (99) Zhong LC, Geng LJ, Njie YF, Feng WK, Song ZH. CB2 cannabinoid receptors in trabecular meshwork cells mediate JWH015-induced enhancement of aqueous humor outflow facility. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2005; 46(6):1988-1992.
- (100) Wagner JA, Varga K, Jarai Z, Kunos G. Mesenteric vasodilation mediated by endothelial anandamide receptors. *Hypertension* 1999; 33(1):429-434.
- (101) Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *British Journal of Pharmacology* 2003; 140(5):790-801.
- (102) O'Sullivan SE, Kendall DA, Randall MD. Heterogeneity in the mechanisms of vasorelaxation to anandamide in resistance and conduit rat mesenteric arteries. *British Journal of Pharmacology* 2004; 142(3):435-442.
- (103) Pacher P, Batkai S, Kunos G. Blood pressure regulation by endocannabinoids and their receptors. *Neuropharmacology* 2005; 48(8):1130-1138.
- (104) Pacher P, Batkai S, Kunos G. Haemodynamic profile and responsiveness to anandamide of TRPV1 receptor knock-out mice. *Journal of Physiology-London* 2004; 558(2):647-657.
- (105) Jarai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR et al. Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96(24):14136-14141.
- (106) Ledent C, Valverde O, Cossu C, Petitot F, Aubert LF, Beslot F et al. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 1999; 283(5400):401-404.

- (107) Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, Kunos G. Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *Faseb Journal* 1998; 12(11):1035-1044.
- (108) Liu J, Batkai S, Pacher P, Harvey-White J, Wagner JA, Cravatt BF et al. Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF-kappa B independently of platelet-activating factor. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(45):45034-45039.
- (109) Wagner JA, Varga K, Ellis EF, Rzigalinski BA, Martin BR, Kunos G. Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature* 1997; 390(6659):518-521.
- (110) Wagner JA, Varga K, Kunos G. Cardiovascular actions of cannabinoids and their generation during shock. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* 1998; 76(12):824-836.
- (111) Wagner JA, Varga K, Kunos G. Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in endotoxic shock. *Faseb Journal* 1998; 12(5):A993.
- (112) Wagner JA, Hu K, Bauersachs J, Karcher J, Wiesler M, Goparaju SK et al. Endogenous cannabinoids mediate hypotension after experimental myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 2001; 38(7):2048-2054.
- (113) Batkai S, Pacher P, Jarai Z, Wagner JA, Kunos G. Cannabinoid antagonist SR-141716 inhibits endotoxic hypotension by a cardiac mechanism not involving CB1 or CB2 receptors. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2004; 287(2):H595-H600.
- (114) Batkai S, Pacher P, Osei-Hyiaman D, Radaeva S, Liu J, Harvey-White J et al. Endocannabinoids acting at cannabinoid-1 receptors regulate cardiovascular function in hypertension. *Circulation* 2004; 110(14):1996-2002.
- (115) Randall MD, Kendall DA, O'Sullivan S. The complexities of the cardiovascular actions of cannabinoids. *British Journal of Pharmacology* 2004; 142(1):20-26.
- (116) Krylatov AV, Ugdyshkova DS, Bernatskaya NA, Maslov LN, Mekhoulam R, Pertwee RG et al. Activation of type II cannabinoid receptors improves myocardial tolerance to arrhythmogenic effects of coronary occlusion and reperfusion. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2001; 131(6):523-525.

- (117) Krylatov AV, Uzhachenko RV, Maslov LN, Bernatskaya NA, Makriyannis A, Mechoulam R et al. Endogenous cannabinoids improve myocardial resistance to arrhythmogenic effects of coronary occlusion and reperfusion: a possible mechanism. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2002; 133(2):122-124.
- (118) Lagneux C, Lamontagne D. Involvement of cannabinoids in the cardioprotection induced by lipopolysaccharide. *British Journal of Pharmacology* 2001; 132(4):793-796.
- (119) Joyeux M, Arnaud C, Godin-Ribuot D, Demenge P, Lamontagne D, Ribuot C. Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts. *Cardiovascular Research* 2002; 55(3):619-625.
- (120) Di Filippo C, Rossi F, Rossi S, D'Amico M. Cannabinoid CB2 receptor activation reduces mouse myocardial ischemia-reperfusion injury: involvement of cytokine/chemokines and PMN. *Journal of Leukocyte Biology* 2004; 75(3):453-459.
- (121) Wagner JA, Hu K, Karcher J, Bauersachs J, Schafer A, Laser M et al. CB1 cannabinoid receptor antagonism promotes remodeling and cannabinoid treatment prevents endothelial dysfunction and hypotension in rats with myocardial infarction. *British Journal of Pharmacology* 2003; 138(7):1251-1258.
- (122) Bouchard JF, Lepicier P, Lamontagne D. Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Life Sci* 2003; 72(16):1859-1870.
- (123) Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflüger's Arch* 1895; 61:291-332.
- (124) Lamontagne D, Rochette L, Vermeulen M, Yamaguchi N, Nadeau R, Dechamplain J. Effect of Sotalol Against Reperfusion-Induced Arrhythmias in Sprague-Dawley and Wistar Rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 1989; 3(6):671-685.
- (125) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979; 76(9):4350-4354.

- (126) Perreault M, Marette A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nature Medicine* 2001; 7(10):1138-1143.
- (127) Giasson E, Meloche S. Role of P70 S6 Protein-Kinase in Angiotensin-II-Induced Protein-Synthesis in Vascular Smooth-Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270(10):5225-5231.
- (128) Scimeca JC, Servant MJ, Dyer JO, Meloche S. Essential role of calcium in the regulation of MAP kinase phosphatase-1 expression. *Oncogene* 1997; 15(6):717-725.
- (129) Schoen FJ. The Heart. In: Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, editors. *Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994: 517-582.
- (130) Kunos G, Batkai S, Offertaler L, Mo F, Liu J, Karcher J et al. The quest for a vascular endothelial cannabinoid receptor. *Chemistry and Physics of Lipids* 2002; 121(1-2):45-56.
- (131) Facci L, DalToso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A. Mast-Cells Express A Peripheral Cannabinoid Receptor with Differential Sensitivity to Anandamide and Palmitoylethanolamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; 92(8):3376-3380.
- (132) Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Shire D, Bouaboula M, Oustric D, Barth F et al. Characterization of two cloned human CB1 cannabinoid receptor isoforms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1996; 278(2):871-878.
- (133) Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, RinaldiCarmona M, Lefur G et al. An Amino-Terminal Variant of the Central Cannabinoid Receptor Resulting from Alternative Splicing. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270(8):3726-3731.
- (134) Mackie K. Cannabinoid receptor homo- and heterodimerization. *Life Sci* 2005; 77(14):1667-1673.
- (135) Prinster SC, Hague C, Hall RA. Heterodimerization of G protein-coupled receptors: Specificity and functional significance. *Pharmacological Reviews* 2005; 57(3):289-298.
- (136) Hillard CJ, Manna S, Greenberg MJ, Dicamelli R, Ross RA, Stevenson LA et al. Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1999; 289(3):1427-1433.

- (137) Baker CL, McDougall JJ. The cannabinomimetic arachidonyl-2-chloroethylamide (ACEA) acts on capsaicin-sensitive TRPV1 receptors but not cannabinoid receptors in rat joints. *British Journal of Pharmacology* 2004; 142(8):1361-1367.
- (138) Underdown NJ, Hiley CR, Ford WR. Anandamide reduces infarct size in rat isolated hearts subjected to ischaemia-reperfusion by a novel cannabinoid mechanism. *British Journal of Pharmacology* 2005; 146(6):809-816.
- (139) Huffman JW, Liddle J, Duncan SG, Yu S, Martin BR, Wiley JL. Synthesis and pharmacology of the isomeric methylheptyl-Delta(8)-tetrahydrocannabinols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 1998; 6(12):2383-2396.
- (140) Huffman JW. The search for selective ligands for the CB2 receptor. *Current Pharmaceutical Design* 2000; 6(13):1323-1337.
- (141) Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Huffman JW et al. Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature* 2000; 404(6773):84-87.
- (142) Ford WR, Honan SA, White R, Hiley CR. Evidence of a novel site mediating anandamide-induced negative inotropic and coronary vasodilator responses in rat isolated hearts. *British Journal of Pharmacology* 2002; 135(5):1191-1198.
- (143) RinaldiCarmona M, Barth F, Heaulme M, Alonso R, Shire D, Congy C et al. Biochemical and Pharmacological Characterization of Sr141716A, the First Potent and Selective Brain Cannabinoid Receptor Antagonist. *Life Sci* 1995; 56(23-24):1941-1947.
- (144) Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millan J, Derocq JM, Casellas P, Congy C et al. SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1998; 284(2):644-650.
- (145) Schmid K, Niederhoffer N, Szabo B. Analysis of the respiratory effects of cannabinoids in rats. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 2003; 368(4):301-308.
- (146) Hillard CJ. Endocannabinoids and vascular function. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2000; 294(1):27-32.
- (147) Begg M, Pacher P, Batkai S, Osei-Hyiaman D, Offertaler L, Mo FM et al. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacology & Therapeutics* 2005; 106(2):133-145.

- (148) Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends in Pharmacological Sciences* 2006; 27(1):1-4.
- (149) White R, Ho WSV, Bottrill FE, Ford WR, Hiley CR. Mechanisms of anandamide-induced vasorelaxation in rat isolated coronary arteries. *British Journal of Pharmacology* 2001; 134(4):921-929.
- (150) O'Sullivan SE, Kendall DA, Randall MD. Characterisation of the vasorelaxant properties of the novel endocannabinoid N-arachidonoyl-dopamine (NADA). *British Journal of Pharmacology* 2004; 141(5):803-812.
- (151) Ho WSV, Hiley CR. Vasodilator actions of abnormal-cannabidiol in rat isolated small mesenteric artery. *British Journal of Pharmacology* 2003; 138(7):1320-1332.
- (152) Pfitzer T, Niederhoffer N, Szabo B. Central effects of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on respiratory and cardiovascular regulation in anaesthetised rats. *British Journal of Pharmacology* 2004; 142(6):943-952.
- (153) Niederhoffer N, Hansen HH, Fernandez-Ruiz JJ, Szabo B. Effects of cannabinoids on adrenaline release from adrenal medullary cells. *British Journal of Pharmacology* 2001; 134(6):1319-1327.
- (154) Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal* 2000; 351:95-105.
- (155) Dokladda K, Green KA, Pan DA, Hardie DG. PD98059 and U0126 activate AMP-activated protein kinase by increasing the cellular AMP : ATP ratio and not via inhibition of the MAP kinase pathway. *Febs Letters* 2005; 579(1):236-240.
- (156) Borsch-Haubold AG, Pasquet S, Watson SP. Direct inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by the kinase inhibitors SB 203580 and PD 98059 - SB 203580 also inhibits thromboxane synthase. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(44):28766-28772.
- (157) Bouchard JF, Chouinard J, Lamontagne D. Participation of prostaglandin E-2 in the endothelial protective effect of ischaemic preconditioning in isolated rat heart. *Cardiovascular Research* 2000; 45(2):418-427.
- (158) Cheah LS, Gwee MCE, Das R, Ballard H, Yang YF, Daniel EE et al. Evidence for the existence of a constitutive nitric oxide synthase in vascular smooth muscle. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2002; 29(8):725-727.

- (159) Rane MJ, Pan Y, Singh S, Powell DW, Wu R, Cummins T et al. Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(30):27828-27835.
- (160) Jayakumar J, Suzuki K, Sammut IA, Smolenski RT, Khan MA, Morrison K et al. Hsp70 gene therapy protects both mitochondrial and ventricular function after ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2000; 102(18):464.
- (161) Lepore DA, Knight KR, Anderson RL, Morrison WA. Role of priming stresses and Hsp70 in protection from ischemia-reperfusion injury in cardiac and skeletal muscle. *Cell Stress Chaperones* 2001; 6(2):93-96.
- (162) Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* 2001; 104(24):2981-2989.
- (163) Laude K, Beauchamp P, Thuillez C, Richard V. Endothelial protective effects of preconditioning. *Cardiovascular Research* 2002; 55(3):466-473.
- (164) Zhao T, Xi L, Chelliah J, Levasseur JE, Kukreja RC. Inducible nitric oxide synthase mediates delayed myocardial protection induced by activation of adenosine A(1) receptors: evidence from gene- knockout mice. *Circulation* 2000; 102(8):902-907.
- (165) Cohen MV, Baines CP, Downey JM. Ischemic preconditioning: from adenosine receptor of KATP channel. *Annual Review of Physiology* 2000; 62:79-109.
- (166) Nagayama T, Sinor AD, Simon RP, Chen J, Graham SH, Jin K et al. Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *Journal of Neuroscience* 1999; 19(8):2987-2995.

Annexe 1 Au cœur du préconditionnement

ischémique (article de vulgarisation publié dans la revue Dire des étudiants aux cycles supérieurs de l'UdM)

Un cœur averti en vaut deux

Le cœur, source de la vie qui coule dans nos veines, doit subir sans faillir les âpretés du quotidien. Pour le métronome de la vie, celles-ci se traduisent souvent par des périodes d'ischémies, moments pendant lesquels le myocarde doit survivre à un manque d'oxygène. L'Évolution ayant toujours favorisé les organismes les mieux adaptés à la vie, le cœur aussi a développé ses mécanismes compensatoires à ces périodes d'ischémies. Depuis quelques années, plusieurs chercheurs se penchent sur la compréhension de ces phénomènes adaptatifs, plus particulièrement le préconditionnement ischémique.

Les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de décès au Canada. Parmi celles-ci,

la maladie cardiaque ischémique demeure celle qui est responsable du plus grand nombre de décès soit environ 22 % de tous les décès survenus en 1992 au Canada.¹ L'infarctus du myocarde représente à lui seul plus de la moitié de ces décès. Paradoxalement, les patients souffrants d'angine présentent un meilleur taux de survie à un infarctus du myocarde que ceux n'ayant pas d'antécédents de maladies cardiovasculaires.

¹ Santé Canada http://www.hc-sc.gc.ca/hpb/lcdc/bcrdd/hdsc/s2_f.html

Le préconditionnement ischémique

L'hypothèse la plus probable pouvant expliquer un tel pronostic est celle du préconditionnement ischémique. Le préconditionnement ischémique est un phénomène adaptatif naturel par lequel une épreuve de nature ischémique de courte durée peut conférer une protection prolongée à un organe envers un dommage de plus forte intensité ou d'une durée plus longue qui pourrait être potentiellement mortel.

L'hibernation est le phénomène naturel connu se rapprochant le plus du préconditionnement et dont le parallèle nous permettra de mieux comprendre cette adaptation du cœur à un stress potentiellement mortel. Lorsqu'un mammifère entre en hibernation, son métabolisme ralentit de façon à lui conférer une résistance aux différents stress environnementaux pouvant survenir. Il peut ainsi survivre avec une réserve énergétique restreinte à un jeûne prolongé. Sa fréquence cardiaque et respiratoire sont aussi diminuées. Le mammifère survit donc à la saison hivernale en diminuant considérablement sa consommation d'énergie.

Lors d'une ischémie, l'apport en oxygène pour l'organe atteint est diminué et celui-ci ne peut produire l'énergie (ATP) nécessaire à son fonctionnement à partir du processus aérobie qui est normalement privilégié. L'organe produit alors l'ATP à partir de la respiration anaérobie et des produits secondaires potentiellement toxiques pour la cellule s'accumulent. Les radicaux oxygénés, les lactates et les protons peuvent être tenus responsables des dommages causés par une ischémie prolongée(162).

Lorsque l'ischémie est de courte durée, ces produits seront éliminés lors de la reperfusion avant d'avoir pu exercer leurs effets délétères sur la fonction cardiaque. En fait, si une deuxième période ischémique survient dans les minutes qui suivent, le cœur récupérera de

cette deuxième épreuve beaucoup plus facilement. La période de protection suivant une première épreuve dite de préconditionnement est d'environ 2 heures. Par la suite, cette protection n'est plus exercée. On retrouvera par contre une deuxième fenêtre de préconditionnement de 24 à 72 heures suivant le préconditionnement. On a appelé cette protection subséquente le préconditionnement tardif(163).

Préconditionnement tardif

Le préconditionnement tardif, qui survient de 24 à 72 heures suite à la première ischémie, n'est pas induit par les mêmes mécanismes que le préconditionnement dit aigu. La fenêtre temporelle de protection est incompatible avec la libération de substances dans l'organisme mais suppose davantage la synthèse de nouvelles protéines. Ainsi, les substances libérées lors de la première ischémie pourraient induire la production de protéines stabilisatrices du squelette cellulaire comme les HSP ou « heat shock protein » qui sont des protéines chaperones pouvant protéger la structure de la cellule et l'empêcher de succomber au stress ischémique. Une enzyme responsable de la production d'oxyde nitrique (NO) appelée iNOS ou « inducible nitric oxide synthase » a aussi été étudiée à cause des propriétés protectrices du NO.

En effet l'oxyde nitrique est généralement accepté dans la communauté scientifique comme étant la molécule qui confère la protection retardée lors du préconditionnement. Des études avec des inhibiteurs pharmacologiques pouvant diminuer la production de cette molécule ainsi qu'avec des molécules pouvant produire le NO de façon exogène ont permis de confirmer cette hypothèse(164).

Préconditionnement aigu

Plusieurs molécules physiologiques peuvent mimer l'effet protecteur du preconditionnement ischémique aigu. L'hypothèse expliquant ce phénomène rassemblant le plus grand nombre de scientifiques est que lors du preconditionnement ischémique ou lors de la reperfusion suivant celui-ci, certaines molécules ayant une activité protectrice sont libérées dans la circulation cardiaque et peuvent induire une modification de la fonction cardiaque lui permettant de survivre à une période ischémique sévère. Parmi ces molécules, l'adénosine, la bradykinine, les opioïdes, les cannabinoïdes et les radicaux oxygénés ont été proposés dans la littérature comme étant des déclencheurs du preconditionnement ischémique. Toutes ces molécules peuvent mimer l'effet protecteur du preconditionnement ischémique lorsqu'elles sont perfusées dans le cœur précédant une période ischémique(165).

Bien que le mécanisme exact reste encore à démontrer, il est naturel de croire que ces molécules diminueront les besoins énergétiques du cœur et lui enverront un message afin que celui-ci économise les molécules d'ATP et retarde l'arrivée de la respiration anaérobie et l'accumulation de substances toxiques.

Le rôle de la mitochondrie

La mitochondrie, source de la production de l'ATP est aussi considérée comme la centrale énergétique cellulaire. La modification de la production d'ATP par celle-ci via l'ouverture de canaux potassiques suite aux stimuli du preconditionnement est une hypothèse expliquant les modifications de la cellule cardiaque lui permettant de s'adapter à ce stress ischémique. Si les mitochondries fournissent plus d'énergie aux cellules, celles-ci pourront survivre plus longtemps. De sorte que si un signal déclenchait une surproduction d'énergie

avant une période ischémique et que la cellule pouvait mettre des molécules d'ATP en réserve, celle-ci pourrait survivre au stress.

La diminution de la force de contraction cardiaque via une diminution du calcium intracellulaire a aussi été proposée comme étant un mécanisme par lequel le cœur pourrait minimiser sa consommation énergétique. Le calcium est une molécule clé dans le phénomène de contraction cardiaque. Plus la quantité de calcium qui entre dans la cellule sera grande, plus la contraction sera forte et consommera d'énergie.

« Ischemic stunning »

Par contre, si la diminution de la force de contraction du cœur est un excellent moyen de diminuer sa consommation énergétique, elle entraînera aussi une diminution du travail fourni par ce cœur. Une diminution du travail cardiaque aura des conséquences sur les performances de celui-ci puisque la quantité de sang éjecté dans le corps s'en trouvera diminué.

L'adaptation du myocarde via le préconditionnement ischémique ne s'effectue donc pas sans conséquence. On a baptisé l'étourdissement ischémique « ischemic stunning » le phénomène qui décrit la diminution des fonctions physiologiques cardiaques induites par une période ischémique. Cette période est beaucoup plus longue que la période qui confère une protection au myocarde. Il peut se passer de quelques heures à quelques jours dépendant de l'intensité de la première ischémie avant que la fonction cardiaque ait récupéré complètement son potentiel de travail.

Pendant cette période, le cœur est plus vulnérable à une augmentation du travail qui pourrait lui être demandé. On comprend donc que le prix que doit payer le corps pour se prévaloir d'une « assurance vie » ischémique est une diminution prolongée de sa capacité de travail subséquente.

Le préconditionnement ischémique chez l'homme

En clinique, plusieurs situations rappellent que le préconditionnement ischémique et l'étourdissement ischémique ont aussi lieu chez l'homme. Les patients souffrant d'angine sont des patients dont le cœur subit plusieurs épisodes non mortels d'ischémie qui sont traduits par des douleurs rétro-sternales. Ces épisodes sont une forme de préconditionnement ischémique et ont des conséquences bénéfiques sur la survie de ces patients lorsque survient un infarctus du myocarde.

De plus, chez ces mêmes patients, il est connu qu'un exercice intense peut entraîner l'apparition de ces douleurs. Cependant, une période de réchauffement, où le patient effectue un exercice court de faible intensité suivi d'une période de repos, permet de diminuer la probabilité de l'apparition d'une telle douleur lors de l'exercice plus intense.

En contrepartie, les patients angineux souffrent aussi d'étourdissement ischémique. Cela se traduit par un risque accru chez ces patients de développer de l'insuffisance cardiaque, qui est une maladie cardiaque dégénérative où le cœur n'arrive plus à fournir le travail nécessaire à la bonne perfusion du corps entier.

Les patients subissant une angioplastie, ceux recevant une greffe cardiaque et ceux subissant une chirurgie cardiaque où une circulation extra-corporelle est nécessaire sont

tous des exemples où le phénomène de préconditionnement ischémique est présent. Chez ces patients, une protection accrue dans les heures qui suivent la procédure ainsi que le jour suivant est présente. Cependant, pendant les jours et les semaines qui suivent, leur capacité cardiaque ainsi que leur résistance à l'effort est réduite.

Il serait idéal de pouvoir mimer les effets bénéfiques du préconditionnement ischémique sans ressentir les effets néfastes de l'étourdissement ischémique. Cependant, on n'a pas encore su dissocier ces effets dans le myocarde et ceci limite les progrès réalisables dans cette voie thérapeutique.

Les maladies cardiaques sont encore l'une des causes de décès parmi les plus importantes en Amérique et la prévention des événements cardiaques, ainsi que la diminution des dommages cardiaques lors de ces événements sont des cibles thérapeutiques d'importance. La compréhension du préconditionnement ischémique ainsi que la découverte d'agents mimant son effet protecteur nous permettront de développer de nouvelles options thérapeutiques pour prévenir et traiter les maladies cardiaques. Le développement de ces nouveaux traitements passe nécessairement par la compréhension des voies de signalisation de ces substances protectrices. Une fois les voies de la protection cardiaque mises en évidence, des molécules plus spécifiques, plus puissantes et plus sécuritaires pourront être développées.

Annexe II La marijuana en usage thérapeutique

Vers un joint USP^a? (article de vulgarisation publié dans la revue Dire des étudiants aux cycles supérieurs de l'UdM)

Un nouveau chapitre du débat sur la légalisation de la marijuana a été écrit lorsque l'on a permis l'utilisation de cette drogue à des fins thérapeutiques. Le Canada est devenu ainsi le premier pays à légaliser l'usage du cannabis à des fins thérapeutiques. Le cannabis n'est pas la seule plante à posséder des propriétés thérapeutiques, mais son usage récréatif et son potentiel d'abus le place sur la frontière entre les drogues douces et les plantes médicinales. Des médicaments comme le Césamet (nabilone) et le Marinol (dronabinol), des dérivés synthétiques du cannabis sont commercialisés et disponibles au Canada sur ordonnance médicale. Les points traités dans le présent article seront les aspects pharmacologiques des cannabinoïdes, les principales différences entre les composés synthétiques et le composé naturel sur une base pharmacothérapeutique et finalement les problèmes posés par l'utilisation des plantes médicinales en thérapie.

Le Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), le principe actif de la marijuana, a été isolé il y a une trentaine d'années. Comme la majorité des principes actifs agissant sur l'organisme, son

^a United State Pharmacopeia est un organisme de contrôle qui dicte les standards de qualité et de composition des produits pharmaceutiques.

effet se produit via des récepteurs, qui ont été nommés récepteurs CB1 et CB2 cannabinoïdes.^b Puisque l'évolution des espèces suit la loi de la sélection naturelle, il est raisonnable de croire que chaque récepteur qui a subsisté à l'évolution possède une fonction qui confère un avantage à l'organisme qui le possède. Des substances présentes naturellement dans l'organismes et pouvant se lier à ces récepteurs ont été identifiées et leurs effets ont été étudiés. L'anandamide, le 2-arachidonylglycérol et le palmitoylethanolamide sont les trois principaux cannabinoïdes endogènes à ce jour. Le récepteur CB1, présent dans le système nerveux central est principalement responsable des effets psychotropes des cannabinoïdes. Le deuxième récepteur, CB2, est quand à lui, surtout présent au niveau des cellules du système immunitaire et est responsable de l'effet immunosuppresseur des cannabinoïdes.^c On retrouve aussi ces récepteurs dans d'autres tissus comme le cœur, les poumons, le système gastrointestinal et le système reproducteur.

^b Ce sont deux récepteurs à sept passages transmembranaires qui sont couplés négativement à l'adénylate cyclase via une protéine G_i. Les deux récepteurs ont conservé un degré d'homologie de l'ordre de 44 % et leurs différences d'activité connues à ce jour se situent au niveau de la modulation de certains canaux ioniques et possiblement de voies de signalisation intracellulaires conduisant à l'expression de différents gènes.

^c C'est par une inhibition de production de cytokines, des substances pouvant activer ou inhiber la réponse immunitaire, et par une diminution de la division des cellules du système immunitaire que les cannabinoïdes ont un effet immunosuppresseur.

De façon générale, les articles scientifiques traitant des cannabinoïdes relèvent un effet protecteur de ceux-ci sur les différents systèmes du corps humain, leur permettant de survivre à certains stress environnementaux tels l'ischémie(166). Les cannabinoïdes, possiblement en causant un ralentissement du métabolisme, induisent une diminution des besoins énergétiques qui confère cette protection. Cette protection se retrouve également au niveau cardiaque suite à une ischémie prolongée via le récepteur CB2(21). On a aussi noté un effet inhibiteur des cannabinoïdes sur la synthèse de certaine protéines, par inhibition de la transcription ou par inhibition directe de la synthèse protéique(46).

Des travaux de recherche ont confirmé que le THC pouvait induire l'expression du récepteur CB1 dans plusieurs régions cérébrales augmentant ainsi l'importance du système aux cannabinoïdes dans la signalisation cérébrale et la modulation des neuromédiateurs cérébraux. Nous ne savons pas encore si les cannabinoïdes endogènes ou les composés synthétiques ont ce même effet. Nous ne connaissons pas non plus encore les effets à long terme d'une telle induction.

Outre les effets de contrôle de la douleur où on utilise les cannabinoïdes comme co-analgésiques, c'est davantage pour leur effet antiémétique qu'ils sont utilisés en thérapie.^d

^d On ne connaît pas encore exactement le mécanisme par lequel les cannabinoïdes ont un effet antiémétique mais on peut émettre l'hypothèse qu'ils agissent via la modulation des canaux ioniques.

Les deux médicaments dérivés des cannabinoïdes commercialisés le sont à titre d'agents antiémétiques.

Ces médicaments, commercialisés sous forme de comprimés, sont absorbés par le tractus gastro-intestinal en environ 30 à 150 minutes selon la variabilité interindividuelle et la présence de nourriture dans l'estomac qui peut retarder l'absorption. De 4 à 12 % de la dose orale sera absorbée par l'organisme et on peut compter environ 60 minutes avant le début d'action. Les composés synthétiques et naturels ont un temps de demie-vie de l'ordre de 32 heures, c'est à dire qu'il faut environ 32 heures à l'organisme pour métaboliser la moitié de la concentration présente dans l'organisme. Il s'agit de composés liposolubles, qui se concentrent donc dans les graisses et le cerveau. Les médicaments auront sensiblement les mêmes effets secondaires que la marijuana au niveau du système nerveux central (SNC). C'est à dire des effets euphorisants, psychotropes et un effet sur la coordination des mouvements. Lorsqu'elle est inhalée, entre 2 à 50 % de la dose de marijuana sera absorbée par les poumons. La grande différence s'explique par la variabilité de la technique d'inhalation. L'absorption sera aussi beaucoup plus rapide à cause de la très grande surface de contact des alvéoles pulmonaires. De plus, une fois entré dans la circulation pulmonaire via les alvéoles, le THC n'a pas à passer par le foie avant de se diriger vers les sites d'action, ce qui explique aussi son plus grand % d'absorption. En contrepartie du sentiment de satisfaction relié à cet effet plus rapide, le potentiel d'abus et de dépendance de la

marijuana inhalée est très supérieur aux composés synthétiques.^c En plus des effets secondaires au niveau du SNC, la fumée engendrée par la combustion de marijuana aura des effets néfastes sur les poumons en saturant les sites de transport d'oxygène via la production de CO et en modifiant la nature même des cellules ciliées de l'épithélium bronchique et ce de façon permanente. En fait, toute fumée inhalée détruira ces cellules ciliées qui seront remplacées par des cellules sans cils, expliquant en partie la toux grasse observée chez les grands fumeurs. Une forte consommation de marijuana peut avoir les mêmes conséquences néfastes que le tabagisme.

En conclusion, en optant pour un comprimé, les patients préservent leurs poumons, diminuent le potentiel d'abus, mais sacrifient une rapidité d'action du médicament, sans éliminer les effets secondaires sur le SNC. Ça explique la faible popularité de ces agents car les patients qui sont prêts à accepter de tels effets secondaires, préféreront l'effet plus rapide de la marijuana inhalée. Afin de remédier au problème du début d'action plus lent des comprimés, la mise sur le marché d'une pompe de type Ventolin pourrait combiner une rapidité d'action à l'absence d'effet néfaste sur l'arbre bronchique. De plus, en augmentant la sélectivité du principe actif pour les récepteurs cannabinoïdes du système gastro-intestinal et en diminuant sa pénétration dans le SNC, on pourrait réduire les effets secondaires psychotropes du médicament et limiter son potentiel d'abus. Malheureusement,

^c On observe le même phénomène lorsque l'on compare les timbres de nicotine avec la cigarette.

en réduisant sa pénétration au niveau du SNC, le danger de réduire aussi l'efficacité du médicament est toujours présent puisque le centre de l'émèse se situe dans le SNC et le site déclencheur du vomissement se situe, quand à lui, au niveau de la barrière hémato-encéphalique.

Jusqu'à ce qu'une forme en inhalation soit commercialisée, il existera donc un avantage à se procurer de la marijuana. Cependant comme avec tous les produits naturels le problème du contrôle existera toujours. Comme il n'existe toujours aucune réglementation quand à la teneur et à la composition des produits naturels, on ne peut pas assumer l'équivalence des produits commercialisés. De plus, en ce qui a trait à la marijuana, puisque plusieurs variétés existent, tout comme certaines variétés issues de plants génétiquement modifiés, cette variation devient encore plus importante. Même si le THC reste le composant actif le plus important, il n'est pas le seul composé actif de la marijuana. Il est important de savoir quelles parties de la plante le patient aura utilisées et pour quelle technique d'inhalation et de combustion il aura opté.

Toutes ces variables rendent le choix de la dose très difficile puisqu'elle sera différente pour chaque patient. De plus, essentiellement pour les mêmes raisons, la réalisation d'une étude clinique comparant la marijuana au placebo est pratiquement impossible à réaliser. Pour tous les produits naturels disponibles présentement, le problème du contrôle demeure

le plus important, de même que celui d'identification des composés actifs contenus dans les produits. Tant qu'aucune norme ou aucun contrôle ne sera établi et respecté par les fabricants, l'utilisation des produits naturels gardera une part aléatoire et inconstante.

Bien que l'assouplissement des lois en ce qui a trait à l'utilisation de la marijuana à des fins thérapeutiques permettent à de nombreux patients de soulager leurs maux et leur permettent de mieux tolérer leurs traitements anticancéreux, elle n'a définitivement pas rendu son usage sécuritaire. En usage thérapeutique, les effets psychotropes de la marijuana ne sont pas souhaités et causent un problème aux utilisateurs qui souhaitent maintenir un comportement social sobre. Les patients utilisant la marijuana ne peuvent s'adonner à des activités nécessitant une importante coordination ou l'usage de leur jugement. Si les médicaments utilisés comporteront fort probablement toujours une part d'effets secondaires, il est sage de s'interroger à savoir si les avantages d'un traitement l'emportent sur les effets néfastes pouvant être engendrés par celui-ci. De plus, la mise sur le marché de produits aussi efficaces affichant un meilleur profil d'effets secondaires devrait être encouragée et favoriserait certainement une plus grande utilisation des cannabinoïdes dans l'arsenal thérapeutique.

Annexe III Recettes de tampons

Tampon de Laemmli (4X Laemmli's loading buffer)

Tris-HCl 1 M (pH 6,8)	2,5 ml
SDS	0,8 g
Glycérol	4,0 ml
β -mercaptoéthanol	2,0 ml
Bleu de bromophénol	0,5 ml
H ₂ O q.s. ad 10 ml	~ 1 ml

Alternative au tampon de Laemmli (6X DTT loading buffer)

Tris-HCl (pH 6,8)	0,35 M
SDS	10,28 % p/v
Glycérol	36 % v/v
DTT	0,6 M
Bleu de bromophénol	0,012 % p/v

Tampon TTBS

Tris-HCl 1 M (pH 8,0)	10 ml
NaCl	8,75 g
TWEEN-20	2 ml
H ₂ O q.s. ad 1L	~ 988 ml

Tampon 10X Tris-Glycine

Tris Base 200mM	30 g
Glycine 1,92M	145 g
H ₂ O q.s. ad 1L	~ 1L

Tampon d'électrophorèse (running buffer)

10X Tris-Glycine	100 ml
SDS 10 %	10 ml (0,1 % p/v)
H ₂ O q.s. ad 1L	~ 890 ml

Tampon de transfert

10X Tris-Glycine	100 ml
Méthanol	200 ml
H ₂ O q.s. ad 1L	~ 700 ml

Stripping buffer

Tris (pH 6,8)	62,5 mM
SDS	2 % p/v
β-mercaptoéthanol	100 mM

Annexe IV Séquence de l'ARNm des récepteurs CB1 et CB2

cDNA provenant de l'ARNm du récepteur CB1 (rattus norvegicus)

1	ttaggtcggt	aggagaactt	actgtgaaca	ggctctttaa	tttcttcaaa	agatgtctcc
61	catttcaagc	aaggagcacc	catggctgag	ggttccctcc	cggcatctct	ttctcagtea
121	ccttgagtct	ggcctaata	aagactgagg	ttatgaagtc	gatcctagat	ggccttgacg
181	acaccacctt	ccgtaccatc	accacagacc	tcctctacgt	gggctcgaat	gacattcagt
241	atgaagatat	caaaggagac	atggcatcca	aattaggata	cttcccacag	aaattccctc
301	taacttctt	caggggtagt	cccttccaag	aaaagatgac	cgcaggagac	aactccccgt
361	tggcccagc	aggagacaca	acaacatta	cagagtctta	taacaagtct	ctctcgtcgt
421	tcaaggagaa	tgaggagaac	atccagtgtg	gggagaactt	tatggacatg	gagtgcctta
481	tgattctgaa	tcccagccag	cagctggcca	tcgctgtact	gtccctcaca	ctgggcacct
541	tcacggttct	ggagaaccta	ctgggtcgtg	gtgtcatcct	gcactcccgc	agtctccgat
601	gcaggccttc	ctaccacttc	atcggcagcc	tggcagtggc	cgacctcctg	ggagtgctca
661	ttttgtgta	cagctttgtt	gacttccatg	tattccac cg	taaagacagc	cccaatgtgt
721	ttctgttcaa	actgggtggg	gttacagcct	ccttcacagc	ttctgtgggc	agcctgttcc
781	tcacagccat	cgacaggtag	atatccattc	acaggcctct	ggcctataag	aggatcgtca
841	ccaggcccaa	ggccgttgtg	gccttttgcc	tgatgtggac	tatcgcaata	gtaatcgtcg
901	tgttgccctt	cctgggctgg	aactgcaaga	agctgcaatc	tgittgctcg	gacattttcc
961	cactcattga	cgagacctac	ctgatgttct	ggattggggg	gaccagtgtg	ctgctgctgt
1021	tcattgtgta	cgcgtacatg	tacattctct	ggaaggctca	cagccacgcg	gtccgcatg a
1081	ttcagcgtgg	gacccag aag	agcatcatca	tccacacgtc	agaagacggc	aagggtcagg
1141	tgaccgggcc	tgaccaagcc	cgcattggaca	ttaggctggc	caaaaccctg	gttctgatcc
1201	tgggtggtgt	gatcatctgc	tggggccctc	tgcttgcgat	catggtgtat	gacgtcttcg
1261	ggaagatgaa	caagcttata	aagacggtgt	ttgccttctg	cagtatgctc	tgctgctga
1321	actccaccgt	gaaccccatc	atctatgctc	tgaggagcaa	ggacctgaga	catgctttcc
1381	gaagcatggt	cccttcgtgc	gaaggcaccg	cacagcctct	agacaacagc	atgggggact
1441	cagactgcct	gcacaagcac	gccaacaaca	cagccagcat	gcacagggcc	gcggagagct
1501	gcatcaagag	caccgttaag	atcgcaagg	tgacctgtc	tgtgtccaca	gacacgtccg
1561	ccgaggctct	gtgagcctgc	tgctttgtg	gc		

segment de 400 bp (1097 – 699)

amorce CB1-5 sens

5' CGT AAA GAC AGC CCC AAT 3'

amorce CB1-3 antisens

5'-CTG GGT CCC ACG CTG AAT- 3'

cDNA provenant de l'ARNm du récepteur CB2 (rattus norvegicus)

1	atggcgggat	gccgggagct	ggagttgacc	aacggctcca	atggcggett	ggagttcaac
61	cctatgaagg	agtacatgat	cttgagtgat	gcgcagcaga	tcgctgtggc	ggtgctgtgt
121	accctgatgg	ggctgctgag	tgccctggag	aacgtggctg	tgctctatct	catcctgtcc
181	tcgcagcggc	tccgcaggaa	gccctcgtag	ctgttcacg	gtagcttggc	cggagctgac
241	ttcctggcca	gcgtgatctt	tgctgcaac	ttcgtcatct	tccatgtc tt	tcacggtgtg
301	gactccagga	atatcttct	gttgaagatc	ggcagcgtga	ccatgacctt	cacggcctct
361	gtgggcagcc	tgctgctgac	tgctgttgac	cgatacctat	gtctgtgcta	cccacctacc
421	tacaaagctc	tcgtcacccg	tgaggaggca	ctggtggccc	ttggtgtcat	gtgggtcctc
481	tcggcgttga	tctctacct	a ccgtcatg	gggtggactt	gttgtcctag	tcctgttct
541	gaacttttcc	ccctgatecc	caacgactac	ctctgggct	ggcttctttt	cattgccatc
601	ctcttttctg	gcatcatcta	tacctatggg	tatgtctctt	ggaaagcaca	ccaacatgta
661	gccagcttga	ctgagcacca	ggacaggcag	gtgcctggga	tagctcggtat	gcggctagac
721	gtgagggttg	ccaagactct	gggcctggtc	atggctgttc	tgctcatatg	ctggttcctt
781	gcactggctc	tcatgggcca	tagcctggtc	accacactga	gtgacaaggt	caaggaggcc
841	ttcgcttct	gctccatgct	gtgccttgtt	aactccatga	tcaatcctat	catttatgcc
901	ctgcggagtg	gagagatccg	ctctgtgcc	cagcactgcc	tgacaggctg	gaagaaatat
961	ctccagggcc	tcggatctga	ggggaagaa	gaagccccaa	agtcctcagt	tacagagaca
1021	gaggctgaga	ctctggctct	gaaggataag	caggagtgtg	gaggagactg	cctgctgcgg
1081	acatcctoga	tccacagccc	catgctgtct	ctggcagatt	cagccaacag	acaagacgtc
1141	cgccccatt	gcccagagga	actaacatgg	tggtgttcag	tgagaagacc	aatcagcctc
1201	cctaataaag	cagggcagtc	cactctgcta	taa		

segment de 200 bp (501 – 289)

amorce CB2-5

5'-TTT-CAC-GGT-GTG-GAC-TCC- 3'

amorce CB2-3

5'-TAG-GTA-GGA-GAT-CAA-CGC- 3'

